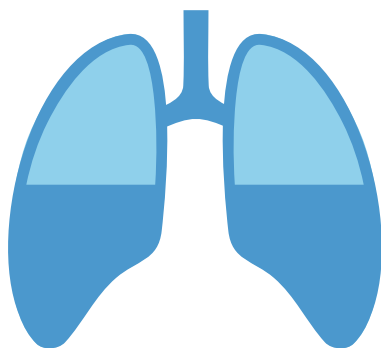


Histomorphologische Untersuchungen zur Anzahl und Lokalisation von Entzündungszellen bei pulmonalerterieller Hypertonie (PAH)

JULIA KOLBE



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Histomorphologische Untersuchungen zur
Anzahl und Lokalisation von Entzündungszellen
bei pulmonalerterieller Hypertonie (PAH)**

**INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

Julia Kolbe
aus Remscheid

Gießen 2014

Aus dem
Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik II
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. R. T. Schermuly

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. S. Wenisch

Tag der Disputation:

23.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1 Definition und Klassifizierung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH).....	1
1.2 Pathogenese der PAH.....	3
1.3 Aktuelle Therapiestrategien der PAH.....	7
1.3.1 Prostanoiden.....	10
1.3.2 Phosphodiesterase-5-Inhibitoren.....	11
1.3.3 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten.....	12
1.4 Die inflammatorische und immunologische Komponente der PAH.....	13
1.5 Mediatoren und Effektoren einer Entzündung.....	13
1.6 Zellen der unspezifischen Abwehr.....	19
1.7 Zellen der spezifischen Abwehr.....	21
1.8 Fragestellung.....	22
1.9 Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Reagenzien.....	25
2.1.3 Lösungen und Puffer.....	26
2.1.4 Antikörper.....	27
2.2 Histologie, Immunhistologie.....	28
2.2.1 Gebrauchsmaterialien.....	28
2.2.2 Geräteliste.....	29
2.3 Methoden.....	30
2.3.1 Versuchsgenehmigung und Patienteneinverständnis.....	30
2.3.2 Gewebegewinnung.....	31
2.3.3 Histomorphologie.....	31
2.3.4 Immunhistochemie.....	33

Kapitel	Seite
2.3.5 Mastzellfärbung.....	36
2.3.6 Gefäßmorphometrie.....	36
2.3.7 Positiv- und Negativkontrollen.....	37
2.3.8 Zellzählung.....	38
2.3.9 Statistische Auswertung.....	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Überblick.....	41
3.2 Histomorphologisches Erscheinungsbild der PAH.....	42
3.2.1 Hämatoxylin/Eosin- Färbung.....	42
3.2.2 Alpha-Actin-Färbung	44
3.2.3 Von-Willebrand-Färbung.....	45
3.2.4 Doppelfärbung.....	46
3.3 Analyse von inflammatorischen Zellen und Immunzellen in Schnitten von gesunden und PH-Lungen	47
3.3.1 Anzahl und Lokalisierung von Mastzellen.....	47
3.3.2 Anzahl und Lokalisierung von Makrophagen.....	52
3.3.3 Anzahl und Lokalisierung von Dendritischen Zellen.....	56
3.3.4 Anzahl und Lokalisierung von T-Lymphozyten.....	61
3.3.5 Anzahl und Lokalisierung von Zytotoxische T-Zellen.....	66
3.3.6 Anzahl und Lokalisierung von Regulatorischen T-Zellen.....	70
4. Diskussion.....	75
5. Zusammenfassung.....	84
6. Summary.....	85
7. Literaturverzeichnis.....	86
8. Erklärung.....	93
9. Danksagung.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung der Pathogenese der PAH	4
Abb. 2	Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings	17
Abb. 3a	CD-68-Färbung Donor-Lunge, Perivaskulärbereich	39
Abb. 3b	CD-68-Färbung Donor-Lunge, Perivaskulärbereich	39
Abb. 3c	CD-209-Färbung PAH-Lunge, Perivaskulärbereich	40
Abb. 4a,c,e	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Donor-Lungen	43
Abb. 4b,d,f	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von PAH-Lungen	43
Abb. 5	Alpha-Actin-Färbung von Donor- und PAH-Lungen	44
Abb. 6	von Willebrand Faktor-Färbung von Donor- und PAH-Lungen	45
Abb. 7	Alpha-Actin- und von Willebrand Faktor- Doppelfärbung von Donor- und PAH-Lungen	46
Abb. 8a,b	Mastzellfärbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH-Lungen	48
Abb. 9	Graphik des Mastzellvorkommens im gesamten Lungenschnitt	48
Abb. 10a,b	Mastzellfärbung Perivaskulärbereich von Donor-und PAH-Lungen	49
Abb. 11	Graphik der Mastzellenverteilung im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	50

Abbildung		Seite
Abb. 12a,b	Positiv- und Negativkontrolle der Mastzellfärbung	51
Abb. 13a,b	CD-68-Färbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH- Lungen	53
Abb. 14	Graphik des Vorkommens von Makrophagen im gesamten Lungenschnitt	53
Abb. 15a,b	CD-68-Färbung Perivaskulärbereich von Donor-und PAH-Lungen	54
Abb. 16	Graphik der Makrophagenverteilung im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	55
Abb. 17a,b	Positiv- und Negativkontrolle der CD 68-Färbung	56
Abb. 18a,b	CD 209-Färbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH-Lungen	57
Abb. 19	Graphik des Vorkommens von Dendritischen Zellen im gesamten Lungenschnitt	57
Abb. 20a,b	CD 209-Färbung Perivaskulärbereich von Donor-und PAH-Lungen	58
Abb. 21	Graphik der Verteilung dendritischer Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	59
Abb. 22a,b	Positiv- und Negativkontrolle der CD-209-Färbung	60
Abb. 23a,b	CD-3-Färbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH-Lungen	61

Abbildung	Seite
Abb. 24 Graphik des Vorkommens von T-Lymphozyten im gesamten Lungenschnitt	62
Abb. 25a,b CD 3-Färbung Perivaskulärbereich von Donor- und PAH-Lungen	63
Abb. 26 Graphik der Verteilung von T-Lymphozyten im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	64
Abb. 27a,b Positiv- und Negativkontrolle der CD-3-Färbung	65
Abb. 28a,b CD-8-Färbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH-Lungen	66
Abb. 29 Graphik des Vorkommens von zytotoxischen T-Zellen im gesamten Lungenschnitt	67
Abb. 30a,b CD-8-Färbung Perivaskulärbereich von Donor- und PAH-Lungen	68
Abb. 31 Graphik der Verteilung zytotoxischer T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	69
Abb. 32a,b Positiv- und Negativkontrolle der CD-8-Färbung	70
Abb. 33a,b FOXP3-Färbung peripheres Lungengewebe von Donor- und PAH-Lungen	71
Abb. 34 Graphik des Vorkommens von regulatorischen T-Zellen im gesamten Lungenschnitt	71
Abb. 35a,b FOXP3-Färbung Perivaskulärbereich von Donor- und PAH-Lungen	72

Abbildung		Seite
Abb. 36	Graphik der Verteilung regulatorischer T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße von Donor- und PAH-Lungen	73
Abb. 37a,b	Positiv- und Negativkontrolle der FOXP3-Färbung	74
Abb. 38	Darstellung der Interaktion von Chemokinen, Zytokinen und Immunzellen beim Prozess des Gefäßremodellings	76
Abb. 39	Schematische Darstellung des pulmonalarteriellen Remodellings	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle		Seite
Tab. 1	Dana Point Klassifikation der PAH von 2008	2
Tab. 2	Modifizierte NYHA-Klassifikation der PAH	8
Tab. 3	Verwendete Chemikalien	24
Tab. 4	Verwendete Reagenzien	25
Tab. 5	Verwendete Puffer und Lösungen	26
Tab. 6	Verwendete Antikörper	27
Tab. 7	Verwendete Gebrauchsmaterialien	28
Tab. 8	Verwendete Geräte	29
Tab. 9	Physiologische Daten der Patienten	30
Tab. 10	Färbeprotokoll Hämatoxylin/Eosin	32
Tab. 11	Färbeprotokoll Antikörperfärbungen	34
Tab. 12	Auflistung der verwendeten Antikörperkonzentrationen	35

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
a.d.	Aqua destillata
ALK1	activin receptor-like kinase 1 gene
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor-2
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
ET-A	Endothelin-Rezeptor A
ET-B	Endothelin-Rezeptor B
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Ig	Immunglobulin
IL-1β	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6
INR	International Normalized Ratio
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie

kD	kilo Dalton
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1-Alpha
mm	Milimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter Thrombozyten
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAPm	pulmonalarterieller Mitteldruck
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	plateled-derived growth factor
PDE-5	Phosphodiesterase-5
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha

uPA	urokinase like Plasminogen Activator
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Definition und Klassifizierung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist ein seltenes, schweres Krankheitsbild, welches oft lebensbedrohliche Formen annimmt. Die Erkrankung betrifft die pulmonale Strombahn und ist geprägt durch eine anhaltende, pathologische Vasokonstriktion, sowie durch Umbauprozesse in den pulmonalen Gefäßen in Form einer Mediahypertrophie, Adventitiafibrose, Endothelzellproliferationen und plexiformen Läsionen (Seeger et al. 2000).

Erstmals beschrieben wurde das Krankheitsbild durch den Wiener Pathologen Julius Klob im Jahre 1865. Klob fiel bei der Autopsie eines Patienten eine ausgeprägte Verengung der distalen Pulmonalarterien, sowie eine in diesem Bereich lokalisierte Arteriosklerose auf (Klob et al. 1865).

1891 griff der Leipziger Internist Ernst Romberg den Befund Klobs erneut auf und beschrieb bei einer eigens durchgeführten Autopsie ebenfalls eine auffällige Sklerose der Lungenarterien (Romberg et al. 1891).

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) wurde ursprünglich in zwei Kategorien eingeteilt, in eine primäre und eine sekundäre PAH. Die Einteilung in die beiden Gruppen erfolgte je nachdem, ob Risikofaktoren oder Ursachen für die Erkrankung vorlagen, oder nicht.

Im Rahmen des zweiten WHO Symposiums der pulmonalen Hypertonie in Evian 1998, sowie des dritten WHO Symposiums in Venedig 2003 wurde diese Einteilung modifiziert und mehr nach klinisch-therapeutischen Kriterien unternommen (Fishman et al. 2001).

2008 wurde die Klassifikation der PAH in Dana Point, Kalifornien, auf dem vierten *World Symposium on Pulmonary Hypertension* aktualisiert und in die aktualisierten Leitlinien übernommen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die 2008 überarbeitete Dana Point Klassifikation.

Dana Point Klassifikation

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

1.1 Idiopathische PAH

1.2 Hereditäre PAH

1.2.1. BMPR2-Mutationen

1.2.2. ALK1, Endoglin-Mutationen (mit und ohne hereditäre hämorrhagische Telangiektasie)

1.2.3. Unbekannte Mutationen

1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht

1.4 Assoziiert mit:

1.4.1. Bindegewbserkrankungen

1.4.2. HIV-Infekt

1.4.3. Portaler Hypertension

1.4.4. Angeborenen Herzfehlern

1.4.5. Schistosomiasis

1.4.6. Chronisch hämolytischer Anämie

1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

1' Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/ oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankung

2.1 Systolische Dysfunktion

2.2 Diastolische Dysfunktion

2.3 Valvuläre Erkrankungen

3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/ oder Hypoxie

3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen

3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen

3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/ obstruktivem Muster

3.4 Schlafbezogene Atemstörungen

3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome

3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe

3.7 Fehlentwicklungen

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus

5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie

5.2 Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell- Histiozytose, Lymphangiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden

5.3 Metabolische Störungen: Glykogen-Speicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen

5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Hämodialyse

Tabelle 1: Dana Point Klassifikation; nach Hoeper et al. 2010

Einleitung

Die aktuelle Klassifikation umfasst fünf Gruppen.

Die vorliegende Studie befasst sich mit Gruppe 1, der PAH.

Hierunter fallen die idiopathische Form der PAH, welche früher als primäre Form bezeichnet wurde, die hereditäre PAH, die medikamenten- oder toxininduzierte PAH, die mit dem Auftreten anderer, systemischer Erkrankungen assoziierte PAH, die persistierende pulmonale Hypertonie von Neugeborenen, sowie die pulmonal-veno-occlusive Erkrankung (PVOD).

Alle Untergruppen der PAH sind gekennzeichnet durch eine Progredienz des pulmonalarteriellen Druckes und die für das Krankheitsbild spezifische Vaskulopathie der arteriellen Gefäße der Lungenstrombahn, das pulmonalarterielle Remodelling.

1.2 Pathogenese der PAH

Eine pulmonale Hypertonie liegt per Definitionem vor ab einem pulmonalarteriellen Mitteldruck (PAPm) ≥ 25 mmHg (Rubin et al. 1997). Der Normwert beträgt PAPm 14 ± 3 mmHg. Bis vor kurzem galt als weiteres Kriterium ein Anstieg des PAPm auf > 30 mmHg unter körperlicher Belastung. Jenes Kriterium wurde jedoch verworfen auf Grund der Tatsache, dass sich auch bei Rechtsherzkatheteruntersuchungen von gesunden Probanden unter Anstrengung beizeiten weitaus höhere Werte für den PAPm als physiologisch erwiesen (Kovacs et al. 2009).

Das Krankheitsbild der PAH resultiert aus anhaltenden, pathologischen Veränderungen von Gefäßstruktur und Gefäßtonus in der Lungenstrombahn. Eine dauerhafte Widerstandserhöhung in den Lungengefäßen führt zu einer Druckbelastung des rechten Ventrikels mit folgender Dysfunktion und der Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie, dem sogenannten *Cor Pulmonale* (Rubin et al. 2006).

Die Patienten haben eine stark eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit und eine verkürzte Lebenserwartung. Ohne Therapie hat ein Patient ab dem Zeitpunkt der Diagnose einer PAH eine mittlere Überlebensdauer von 2-8 Jahren.

Der dauerhaft erhöhte pulmonalarterielle Druck resultiert aus der Kombination von Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße, pulmonalarteriell Remodelling und *in Situ* Thrombosen durch plexiforme Läsionen an den Gefäßen.

Diese Vorgänge wiederum führen zu einer verminderten Gefäßelastizität und einer Einengung des Gefäßlumens (Rubin et. al. 2006).

Unter dem Begriff des pulmonalarteriellen Remodellings sind zelluläre Veränderungen innerhalb der unterschiedlichen Gefäßschichten zu verstehen. So kommt es zu einer Verdickung der Mediaschicht durch eine Hyperplasie und Hypertrophie der glatten

Einleitung

Muskelzellen, zu einer Verdickung der Adventitia durch Proliferation von Fibroblasten und einer Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, sowie zu Läsionen im Bereich der Intima (Pietra et. al. 2004, Humbert et. al. 2004).

All diese Veränderungen innerhalb der Wandschichten der Lungengefäße führen zu einer insgesamt Verdickung und Versteifung der Gefäße (Rabinovitch et al. 2008), (Abb. 1).

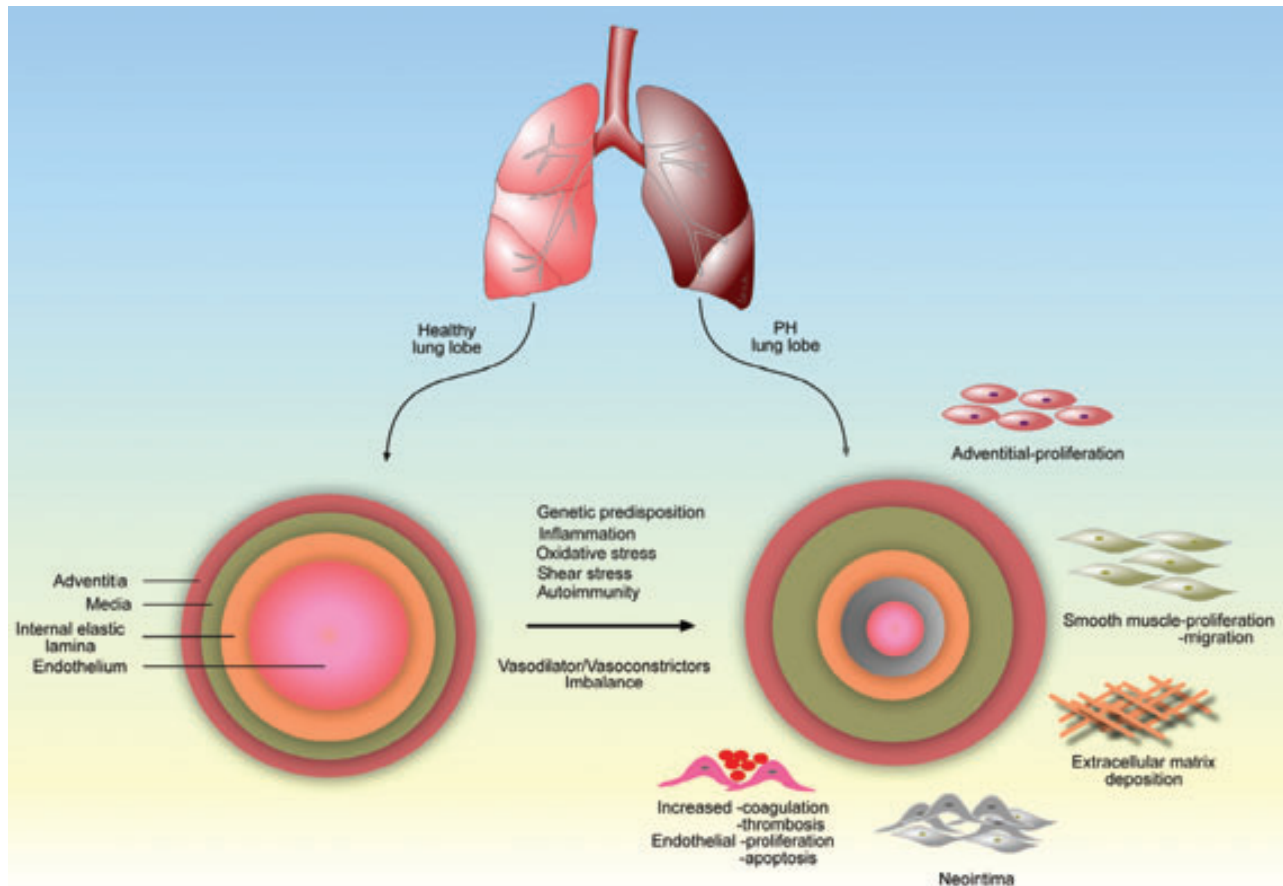


Abb. 1: Schematische Darstellung der pathologischen Veränderungen in pulmonalerteriellen Gefäßen; S. S. Pullamsetti et al., 2009

Abbildung 1 beschreibt die Pathogenese der PAH. Es zeigt eine schematische Darstellung der pathologischen Veränderungen in pulmonalerteriellen Gefäßen, welche zur Entstehung und zum Fortschreiten der PAH führen.

Gefäßverletzungen und eine folgernde endotheliale Dysfunktion, bedingt durch viele verschiedenen Stimuli (genetische Disposition, Entzündungen, oxidativer Streß, erhöhte Scherkräfte, autoimmunologisches Geschehen etc.) führen zu einer vermehrten Produktion endothelialer Mediatoren und Wachstumsfaktoren. Diese wiederum bedingen eine Vasokonstriktion, Proliferation, Migration von pulmonalerteriellen Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, was zum sogenannten pulmonalerteriellen Remodelling und zu einer In-Situ-Thrombose führt (Rabinovitch et al. 2008, Budhiraja et al.

Einleitung

2004). Die hieraus resultierende Verdickung der Gefäßwandschichten mit gleichzeitiger Reduktion der pulmonalarteriellen Gefäßlumina führt zu einem erhöhten vaskulären Widerstand innerhalb dieser Gefäße und somit zum Charakteristikum der PAH (Tuder et al. 2001).

Immer mehr Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine endotheliale Dysfunktion die zentrale Rolle bei der Entstehung und Manifestation der PAH spielt (Tuder et al. 2001, Lopes et al. 2000).

Die auslösenden Faktoren, die zu dem Krankheitsbild der PAH führen, konnten bis dato nicht wirklich identifiziert werden. Jedoch wird in Betracht gezogen, dass ein initialer Trigger in Form von Scherkräften, einer chronischen Hypoxie, einer Entzündung oder viralen Infektion und weitere Unbekannte eine Dysfunktion des Endothels hervorrufen können. Eine genetische Prädisposition wird ebenfalls diskutiert. Die endotheliale Dysfunktion wiederum führt zu der Produktion und Freisetzung von endothelialen Botenstoffen und Entzündungsmediatoren, welche in die Pathogenese der PAH eingebunden sind (Budhiraja et al. 2004).

Das Endothel der pulmonalen Gefäße hat ursprünglich eine vasoprotektive Funktion. So moduliert es den Gefäßtonus, die Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen, die Funktion der Thrombozyten, sowie die Bildung einer extrazellulären Matrix (Loscalzo et al. 1992). Unterstützt wird diese vasoprotektive Funktion durch Mediatoren wie das Prostazyklin und das Stickstoffmonoxid, welche auf ihre Weise gefäßrelaxierend und antiproliferativ wirken und die Plättchenaggregation hemmen (Olschewski et al. 2001, Christman et al. 1992).

Vasokonstriktorisches und proliferatives Mediatoren wie Endothelin-1, Serotonin, Thromboxan oder der Wachstumsfaktor Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) spielen bei der Entwicklung der PAH ebenfalls eine Rolle (Giaid et al. 1993, Tuder et al. 2001, Humbert et al. 2004, Schermuly et al. 2005). Sie wirken stimulierend auf die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen und bewirken eine Plättchenaggregation.

Eine Dysfunktion des Endothels mit dem Verlust seiner vasoprotektiven Eigenschaften, sowie ein Ungleichgewicht zwischen antiproliferativen, relaxierenden und proliferativen Mediatoren führt zu Entstehung und Progress der PAH (Loscalzo et al. 1992, Tuder et al. 1999, Chen et al. 2000, Dandel et al. 2005).

Zu den Entzündungsmediatoren zählen Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. All diese Entzündungsmediatoren führen zu einer Akkumulation von inflammatorischen Zellen mit einer Initialisierung diverser Entzündungsreaktionen, welche

Einleitung

wiederum zu einer Proliferation der Gefäßzellen führen (Hassoun et al. 2009, Dorfmueller et al. 2003).

Inflammation und Immunsystem spielen daher eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Progression der PAH.

So wurde bei Patienten mit PAH ein vermehrtes Vorkommen von zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) und P-Selektin gemessen (Fartoukh et al. 1998, Humbert et al. 1995, Sakamaki et al. 2000).

Die Rolle der Entzündungsmediatoren bei der Entstehung der PAH wird außerdem verdeutlicht durch die vermehrte Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen im Bereich der Lungenstrombahn wie Fraktalkin CX3CL1, CCL2 (MCP-1) und das Chemokin CCL5 (RANTES) (Balabanian 2002, Dorfmueller et al. 2002, Sanchez et al. 2007).

Tuder et al. (Tuder et al. 1994) beschrieben das perivaskuläre Vorkommen von inflammatorischen Zellinfiltraten im Bereich von plexiformen Läsionen der Lungengefäße, bestehend aus T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen.

Neuere Studien von Perros et al. zeigten eine Anhäufung von dendritischen Zellen im Bereich solcher Gefäßläsionen bei PAH-Patienten (Perros et al. 2007).

1.3 Aktuelle Therapiestrategien der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist eine schwere, progressive Erkrankung, die durch einen anhaltend erhöhten pulmonalarteriellen Gefäßwiderstand zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion führen kann. Ohne Behandlung ist der Verlauf der PAH häufig letal.

Für kaum eine kardiopulmonale Erkrankung gab es in den letzten Jahren so viele Fortschritte und Wandlungen im Bereich der Therapie.

Um die PAH adäquat behandeln zu können, ist es erforderlich ein genaues Bild vom Schweregrad der Erkrankung des Patienten zu bekommen.

Für eine Festlegung des Schweregrades stehen sowohl nicht-invasive, als auch invasive Methoden zur Verfügung.

Zu den nicht-invasiven Methoden gehören beispielsweise der 6-Minuten Gehtest (*six-minute-walk*), die Echokardiographie und die Spiroergometrie. Diese Untersuchungen eignen sich auch im weiteren Verlauf als prognostische Parameter. Weiterhin erfolgt eine Einteilung des Patienten in die Klassen der modifizierten Klassifikation der New York Heart Association (NYHA), (Simonneau et al. 2004).

Modifizierte New York Heart Association (NYHA)-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie
Schweregrade der pulmonalen Hypertonie
Klasse 1
Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkungen der körperlichen Belastbarkeit. Eine normale körperliche Aktivität führt nicht zu Beschwerden wie Dyspnoe, Thoraxschmerz oder Synkopen
Klasse 2
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit leichten Einschränkungen bei körperlicher Belastung. Beschwerdefreiheit in Ruhe. Normale körperliche Anstrengung führt zu Dyspnoe, Thoraxschmerz oder Synkopen.
Klasse 3
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit einer deutlichen Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit. Beschwerdefreiheit in Ruhe. Geringe körperliche Belastungen führen zu Dyspnoe, Thoraxschmerz oder Synkopen.
Klasse 4
Patienten mit pulmonaler Hypertonie, die in keiner Weise körperlichen Anstrengungen oder Aktivitäten nachgehen können. Dyspnoe und Abgeschlagenheit können bereits in Ruhe auftreten. Es liegen Zeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz vor. Bei geringsten körperlichen Anstrengungen oder Aktivitäten treten Dyspnoe, Thoraxschmerz oder Synkopen auf.

Tabelle 2: NYHA-Klassifikation der PH; nach Hoeper et al. 2010

Als abschließende, invasive diagnostische Untersuchung wird eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchung kann die Diagnose PAH gestellt und neben der Abschätzung des Schweregrades die Ätiologie weiterführend abgeklärt werden.

Im Rahmen der Rechtsherzkatheteruntersuchung sind folgende Parameter unbedingt zu

Einleitung

bestimmen: der rechtsatriale Druck, der pulmonalarterielle Druck, der pulmonalkapilläre Verschußdruck, das Herzzeitvolumen, sowie die gemischt-venöse Sättigung (Hoeper et al. 2004).

Im Hinblick auf die Therapiestrategie kann während der Rechtsherzkatheteruntersuchung eine pulmonale Vasoreagibilitätsprüfung erfolgen. Hierzu wird meist inhalatives Stickstoffmonoxid (NO) verabreicht. Eine Messung der Hämodynamik kann bereits nach fünf Minuten durchgehender NO-Inhalation erfolgen. Der Vasoreagibilitätstest fällt positiv aus, wenn es auf die NO-Inhalation hin zu einem Abfall des mittleren Pulmonalarteriellen Druckes (mPAP) um > 10 mmHg vom Ausgangswert kommt (Galie et al. 2004).

Der Vasoreagibilitätstest dient zur Abklärung der Frage, ob bei einem Patienten eine Therapie mit Kalziumantagonisten in Frage kommt.

Bei der Entstehung der PAH kommt es zu einem Mißverhältnis von vasoprotektiven Mediatoren, wie Prostazyklin und Stickstoffmonoxid, welche gefäßrelaxierend und antiproliferativ wirken, sowie die Plättchenaggregation hemmen (Olschewski et al. 2001, Christman et al. 1992), und vasokonstriktorisches und proliferativ wirksamen Mediatoren wie Serotonin, Thromboxan und Endothelin-1 (Schermyly et al. 2005, Humbert et al. 2004, Tuder et al. 2001).

Auf Grund der dominierenden, vasokonstriktorisches Komponente bei der Entstehung der PAH wird primär der therapeutische Einsatz von vasodilatativ wirksamen Stoffen untersucht und praktiziert.

Bei der Therapie der PAH muß unterschieden werden zwischen sogenannten Basismaßnahmen und der gezielten Therapie.

Zu den Basismaßnahmen zählen die orale Antikoagulation, die Gabe von Sauerstoff und die Behandlung mit Diuretika im Falle der Ausbildung von Ödemen oder Aszites (Hoeper et al. 2006).

Zur oralen Antikoagulation liegen zur Zeit noch unzureichende Daten vor. Bei einem Fehlen von Kontraindikationen wird empfohlen, die Patienten mit oralen Antikoagulanzen zu therapieren, der Ziel-INR-Wert liegt bei 2,0-3,0 (Hoeper et al. 2010).

Die Gabe von Sauerstoff sollte individuell erfolgen, sie wird jedoch bei einer Sauerstoffsättigung $< 90\%$ empfohlen (Hoeper et al. 2010). Der Einsatz von Diuretika sollte klinisch indiziert sein. Die gezielte Therapie der PAH bezieht sich auf die Senkung des erhöhten pulmonalarteriellen Widerstandes durch den Einsatz vasodilatativer Substanzen.

Hierzu zählen Prostanoiden, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren.

Einleitung

Der Einsatz von Kalziumantagonisten sollte eher zurückhaltend erfolgen und nur bei Patienten mit PAH, die zur Gruppe 1 der Dana Point Klassifikation zählen (keine anderen Formen der PH), und hier auch nur bei Patienten, die den Vasoreagibilitätstest positiv bestanden haben (Sitbon et al. 2005).

1.3.1 Prostanoid

Das Prostazyklin Epoprostenol war, intravenös verabreicht, die erste in der Therapie der PAH eingesetzte Substanz (Barst et al. 1996).

Prostazyklin gehört zu den Eicosanoiden und wird durch die Cyclooxygenase aus Arachidonsäure synthetisiert. Die Prostazyklinsynthese findet in den Endothelzellen der Blutgefäße statt. Prostazyklin hat eine vasodilatative, antiproliferative und antiaggregatorische Wirkung. Des Weiteren ist Prostazyklin der stärkste endogene Plättchenaggregationshemmer (Moncada et al. 1976).

Zu den heute in der Therapie der PAH verwendeten Prostanoiden zählen Iloprost und Treprostinil.

Iloprost ist ein stabiles Prostazyklinderivat. Durch Bindung an spezifische Membranrezeptoren kommt es zu einer Stimulierung der Adenylat-Zyklase, woraus wiederum ein Anstieg des zyklischen 3,5-Adenosin-Monophosphat (cAMP)-Gehaltes resultiert. Über eine Erhöhung der cAMP-Spiegel in den glatten Muskelzellen wird durch Iloprost eine vasodilatatorische Wirkung erzielt. Weiterhin kann Iloprost die vasokonstriktorische Wirkung von Endothelin-1 auf Gefäße funktionell antagonisieren.

Bei Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt es durch Iloprost zu einer starken inhibitorischen Wirkung auf die Thrombozytenaggregation.

Iloprost besitzt weiterhin antiproliferative und antifibrotische Wirkungen.

Eine intravenöse Therapie mit Prostazyklinen ist nur möglich bei kontinuierlicher Applikation und erfordert daher auch einen permanenten zentralvenösen Zugang. Diese Therapiebedingungen erfordern einen erhöhten therapeutischen Aufwand, hohe Kosten und für den Patienten ein erhöhtes Risiko für katheterassoziierte Infektionen und resultierende septische Komplikationen. Die intravenöse Therapie mit Prostazyklinen wird aus erwähnten Gründen in Deutschland eher zurückhaltend angewendet (Hoeper et al. 2002, 2010).

Iloprost inhalativ angewendet ist in Deutschland zugelassen für Patienten mit PAH im Stadium NYHA III.

Das Prostazyklin-Analogon Treprostinil wurde in Deutschland für eine Therapie nach subkutaner Verabreichung durch die Arzneimittelbehörde zugelassen (Hoeper et al. 2010).

1.3.2 Phosphodiesterase-5-Inhibitoren

Der Phosphodiesterase-5-Inhibitor (PDE-5-Inhibitor) Sildenafil ist seit 2004 für die Therapie der PAH zugelassen.

PDE-5-Inhibitoren sind Substanzen, die die Funktion der Phosphodiesterase-5 (PDE-5) hemmen.

Die PDE-5 ist in der Lage, den second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) selektiv abzubauen. cGMP seinerseits wird durch Stickstoffmonoxid aktiviert und ist mit an der Relaxation der Gefäßmuskulatur beteiligt. PDE-5-Inhibitoren hemmen den Abbau von cGMP und verstärken somit die gefäßerweiternde Wirkung des Stickstoffmonoxid.

Unter Therapie mit Sildenafil zeigte sich bei Patienten mit PAH eine Verbesserung der Hämodynamik und Belastbarkeit (Galie et al. 2005).

Sildenafil wird heute angewendet zur Therapie von PAH und PAH Patienten in den Stadien NYHA II und III (Hoeper et al. 2010).

1.3.3 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Für die Therapie der PAH zugelassene Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sind Bosentan und Ambrisentan.

Endothelin-1 ist ein hochpotenter Vasokonstriktor, dessen Bildung in den Endothelzellen durch Hypoxie induziert wird. Endothelin-1 bindet an zwei Rezeptortypen, den Endothelin-Rezeptor-A (ET-A) und -Rezeptor-B (ET-B). Das größte Vorkommen von ET-A Rezeptoren befindet sich in glatten Muskelzellen und in kardialen Myozyten. Durch eine Interaktion von Endothelin-1 mit dem ET-A Rezeptor kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zu einer Vasokonstriktion.

Bosentan ist ein dualer Endothelin-Rezeptorantagonist, der sowohl Affinität zu ET-A als auch zu ET-B-Rezeptoren besitzt. Die Affinität zu den ET-A-Rezeptoren ist jedoch etwas höher als die zu den ET-B-Rezeptoren. Bosentan konkurriert mit Endothelin-1 spezifisch um die Bindung am ET-A und ET-B-Rezeptor, es bindet an keine anderen Rezeptoren.

Auf diese Weise reduziert Bosentan sowohl den pulmonalen als auch den systemischen Gefäßwiderstand.

Die Substanz Ambrisentan ist ein hochselektiver ET-A-Rezeptorantagonist.

Bosentan ist für die Therapie bei PAH und PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen und kongenitalen Vitien im Stadium NYHA II und III zugelassen.

Ambrisentan ist ebenfalls zugelassen für die Therapie bei PAH und PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen (Hoepfer et al. 2010).

Alle zugelassenen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sind potentiell hepatotoxisch.

Unter einer Therapie sind regelmäßige Kontrollen der Transaminasen in vierwöchigen Abständen unerlässlich.

Unter einer Therapie mit Bosentan kommt es bei PAH-Patienten zu einer verbesserten Hämodynamik, körperlichen Belastbarkeit und Lebensqualität (Channik et al. 2001, Rubin et al. 2002, Sitbon et al. 2004, Hoepfer et al. 2005).

1.4 Die inflammatorische und immunologische Komponente der PAH

Eine Entzündungsreaktion ist die Antwort des Immunsystems auf Noxen wie eine Infektion oder eine Verletzung von Gewebe (Libby et al. 2007).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Diese Mediatoren wiederum bewirken eine Zunahme der vaskulären Permeabilität und führen zu einer Ansammlung von Leukozyten.

Die erhöhte vaskuläre Permeabilität führt zu einer Extravasation von Plasma-Proteinen, was seinerseits ebenfalls eine Verstärkung der Entzündungsreaktion mit sich bringt.

Kommt es zu einer anhaltenden Infektion oder einer dauerhaften Antigenexpression, wiederkehrenden Gefäßläsionen oder einem Versagen der körpereigenen antiinflammatorischen Mechanismen, so kann sich eine chronische Entzündung ausbilden (Libby et al. 2007).

Bei einer akuten Entzündung kommt es zunächst zu einer Reaktion des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Immunzellen wie dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten bilden hierbei die erste Barriere.

Diese Zellen aktivieren die Zellen des adaptiven, spezifischen Immunsystems. Hierzu zählen die B-Lymphozyten, die T-Helfer-Zellen (CD4) und die zytotoxischen T-Zellen (CD8).

Auch die Zellen des adaptiven Immunsystems können wiederum zu einer Aktivierung des unspezifischen Immunsystems führen (Medzhitov et al. 2008).

Im Rahmen des pulmonalarteriellen Remodellings spielen frei zirkulierende Zellen wie Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Lymphozyten genauso eine wichtige Rolle wie Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen.

Im Bereich plexiformer Gefäßläsionen kommt es zur Adhäsion der zirkulierenden Immunzellen an Endothelzellen und zu einer Invasion in die Gefäßintima.

Die freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren agieren als eine Art Kommunikatoren zwischen den frei zirkulierenden Immunzellen und den Zellen der pulmonalen Gefäße.

Sämtliche Interaktionen zwischen Immunzellen, Mediatoren und Gefäßzellen führen zum pulmonalarteriellen Remodelling (Davis et al. 2003).

1.5 Mediatoren und Effektoren einer Entzündung

Bei der Entstehung einer Entzündung wird die Bildung einer Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren induziert, welche wiederum die Funktion verschiedener Gewebe und Organe verändern. Entzündungsmediatoren können von Plasmaproteinen gebildet werden, oder sie können von zirkulierenden und stationären Zellen des Gefäßsystems abgegeben werden.

Einleitung

Entzündungsmediatoren können vasoaktive Amine, vasoaktive Peptide, Fragmente von Komplement-Komponenten, Zytokine, Chemokine oder proteolytische Enzyme sein (Davis et al. 2003, Medzhitov et al. 2008). Chemotaktische Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und dem Dirigieren der Leukozyten im Rahmen der pulmonalen Hypertonie. So steuern sie beispielsweise die Adhäsion und Extravasation von Leukozyten in entzündetem Gewebe. Über eine Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren kommt es im Rahmen der Pathogenese der PAH zu einer Rekrutierung und Aktivierung von unspezifischen und spezifischen Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, B.- und T-Lymphozyten (Abb. 2). Eine erhöhte Serumkonzentration von proinflammatorischen Zytokinen und eine lokale Expression von Chemokinen wird bei PAH-Patienten vorgefunden (Pullamsetti et al. 2010).

IL-1, IL-6 und TNF- α

Patienten, die unter idiopathischer oder assoziierter pulmonalarterieller Hypertonie leiden, weisen höhere Konzentrationen, sowie eine höhere, pulmonale Expression von Interleukin-1- β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α auf als gesunde Probanden (Humbert et al. 1995).

Voelkel et al. (Voelkel et al. 1994) untersuchten die Rolle von Interleukin-1, einem potenten proinflammatorischen Zytokin, in einem Modell mit Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie und verglichen die Ergebnisse mit jenen, die bei durch chronische Hypoxie induzierter pulmonaler Hypertonie vorlagen.

IL-1 wurde in den Lungen mit Monocrotalin behandelter Ratten in exzessiven Mengen gebildet (Voelkel et al. 1994). Durch wiederholte Injektionen eines IL-1 Rezeptor-Antagonisten konnte das Ausmaß der pulmonalarteriellen Hypertonie und die Rechtsherzhypertrophie im Monocrotalin-Modell deutlich reduziert werden, nicht jedoch im Modell der chronischen Hypoxie (Voelkel et al. 1994).

Humbert et al. (Humbert et al. 1994) fanden erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem IL-1 und IL-6 im Serum von Patienten, die an schwerer pulmonalarterieller Hypertonie litten und postulierten daraufhin eine möglicherweise wichtige Rolle der Entzündungsmediatoren bei einigen Formen der pulmonalen Hypertonie.

Vor nicht allzu langer Zeit wurde entdeckt, dass transgene Mäuse, die Übermengen an IL-6 produzierten, spontan ein pulmonalarterielles Remodelling zeigten und die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (Steiner et al. 2009).

Transgenetische Mäuse, bei denen eine Überproduktion an TNF- α vorlag, entwickelten ebenfalls eine schwere pulmonale Hypertonie, sowie eine Rechtsherzhypertrophie (Fujita et al. 2002).

Fraktalkine

Fraktalkine (CX3CL1) kann sowohl in membrangebundener Form, als Adhäsionsmolekül, als auch in löslicher Form vorkommen. In löslicher Form ist Fraktalkine strukturell eindeutig ein chemotaktisches Protein. Fraktalkine vermittelt seine Wirkung über CX3CR1, einen transmembranösen Rezeptor, der von Monozyten, dendritischen Zellen, Neuronen, Mikrogliazellen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen und von Subpopulationen der T-Lymphozyten exprimiert wird (Pullamsetti et al. 2010, Paul et al. 2009).

Balabanian et al. fanden heraus, dass Fraktalkine bei PAH-Patienten in zirkulierenden CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten stark erhöht ist im Vergleich zu gesunden Probanden (Balabanian et al. 2002). Andererseits wiesen PAH-Patienten auch eine signifikant höhere Konzentration an löslichem Fraktalkine in ihrem Plasma auf.

Des Weiteren konnte in PAH-Lungenproben eine erhöhte Expression von Fraktalkine mRNA detektiert werden im Vergleich zu gesunden Lungenproben (Balabanian et al. 2002). Die Endothelzellen pulmonalarterieller Gefäße von PAH-Patienten enthielten Fraktalkine.

Perros et al. zeigten, dass Fraktalkine gebildet wurde von inflammatorischen Zellen, die sich im Bereich plexiformer Gefäßläsionen befanden und dass glatte Gefäßmuskelzellen dieser Gefäße eine vermehrte Menge an Fraktalkine bildeten (Perros et al. 2007).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen von kultivierten, pulmonalarteriellen Gefäßen bei Ratten den Rezeptor CX3CR1 aufwiesen und dass Fraktalkine die Proliferation von glatten Muskelzellen bewirkte. Fraktalkine könnte also als ein Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen pulmonalarterieller Gefäße fungieren (Perros et al. 2007).

Rantes

RANTES zählt zur Gruppe der Interleukin-8 Superfamilie der Zytokine. RANTES steht für „regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted“. Dieses Zytokin rekrutiert T-Lymphozyten und Monozyten über verschiedene Chemokin-Rezeptoren (CCR1, CCR3, CCR5).

Dorfmueller et al. zeigten, dass in Proben von PAH-Lungen ein vermehrtes Vorkommen von RANTES mRNA festzustellen war im Vergleich zu Proben gesunder Lungen (Dorfmueller et al. 2002). Dorfmueller et al. vermuteten, dass jene mRNA von den Endothelzellen stammte. Zum jetzigen Zeitpunkt sind weiterführende Untersuchungen nötig, um die genaue Relevanz dieser Erkenntnisse für die Pathophysiologie der PAH herauszufinden (Dorfmueller et al. 2002).

Monocyte Chemotactic Protein-1 und CCR2

Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1 / CCL2) gehört mit zu den relevantesten Zytokinen, die von Gefäßzellen synthetisiert werden. Es ist ein äußerst potenter Mediator für die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen. MCP-1 vermittelt seine Wirkung über den Rezeptor CCR-2, der von zahlreichen Zelltypen präsentiert wird, unter anderem auch von Monozyten und glatten Muskelzellen. MCP-1 bewirkt eine Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und induziert darüber eine Sekretion von Zytokinen und die Bildung von Adhäsionsmolekülen. Bei einem Vergleich von PAH Patienten mit gesunden Probanden fiel auf, dass im Plasma und im Lungengewebe der PAH-Patienten deutlich höhere Spiegel an MCP-1 vorzufinden waren als dies bei gesunden Probanden der Fall war (Itho et al. 2006). Weiterhin konnte eine vermehrte Bildung von MCP-1 durch pulmonale Endothelzellen und glatte Muskelzellen in pulmonalarteriellen Gefäßen nachgewiesen werden (Sanchez et al. 2007). In Abwesenheit von pulmonalen Endothelzellen, insbesondere bei PAH-Patienten, war die Migrationsrate von Monozyten deutlich erhöht, hingegen konnte sie durch MCP-1 blockierende Antikörper signifikant reduziert werden (Sanchez et al. 2007). Glatte Muskelzellen pulmonalarterieller Gefäße von PAH-Patienten zeigten nach Stimulierung durch MCP-1 eine deutlich erhöhte Tendenz zur Migration und Proliferation im Vergleich zu glatten Muskelzellen bei gesunden Probanden. Daraus lässt sich eine wichtige Rolle von MCP-1 für die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie folgern.

CXCL 12

CXCL 12, oder auch „stromal cell-derived factor-1 α “, ist ein kleines Zytokin, das zur Familie der Chemokine gehört. Seine Hauptaufgabe liegt in der Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten. CXCL 12 wird zum Beispiel aktiviert durch proinflammatorische Stimuli in Form von Lipopolysacchariden, TNF-Alpha und Interleukin-1. Young et al. untersuchten die Rolle von CXCL 12 und seinem Rezeptor CXCR 4 am Modell hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie von neonatalen Mäusen (Young et al. 2009). Young et al. konnten zeigen, dass eine Hemmung der CXCL 12-CXCR 4 – Achse zu einer verminderten Bildung von Progenitorzellen in den Lungen und in den rechten Ventrikeln bei diesen mit Hypoxie behandelten Mäusen führte (Young et al. 2009). Außerdem kam es durch die Hemmung der CXCL12-CXCR4-Achse zu einer verminderten Zellproliferation und Zellapoptose in den pulmonalen Gefäßen und stattdessen konnte die Prävention eines hypoxie-induzierten pulmonalarteriellen Gefäßremodelings bei neonatalen Mäusen beobachtet werden (Young et al. 2009).

Einleitung

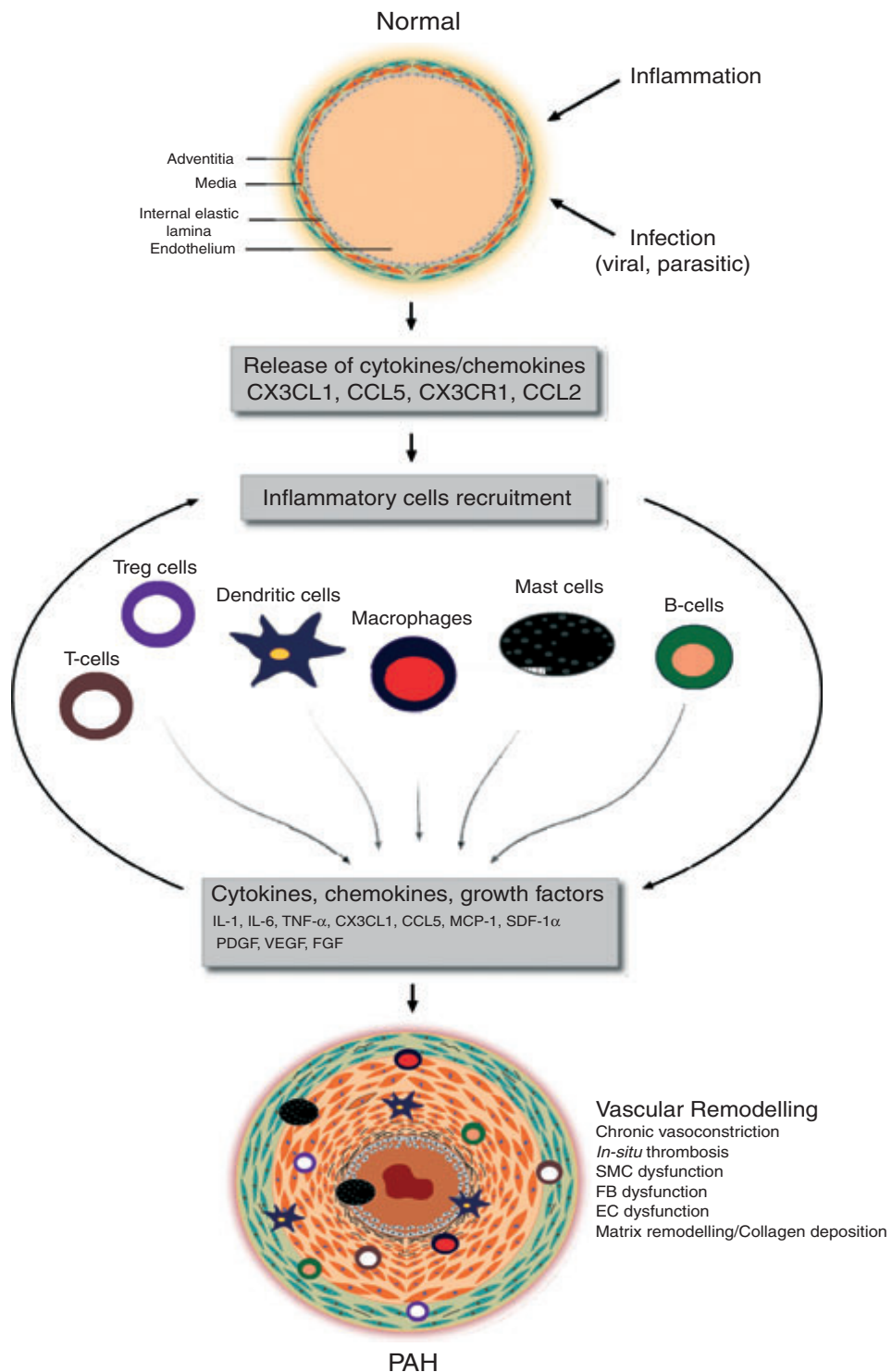


Abb. 2: Schematische Darstellung des infektiös- und inflammatorisch vermittelten vaskulären Remodellings; S. S. Pullamsetti, R. Savai et al., 2011;

Abbildung 2 gibt eine schematische Darstellung des infektiös- und inflammatorisch getriggerten vaskulären Remodellings. Als Reaktion auf infektiöse und inflammatorische

Einleitung

Geschehen beginnen die pulmonalarteriellen Gefäßzellen Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Zytokine zu produzieren (Libby et al. 2007) und locken dadurch Entzündungszellen an wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und T-Regulatorzellen an. Durch ein Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren und Entzündungszellen kommt es zur Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese Prozesse führen zum pulmonalarteriellen Remodelling durch einen Umbau der Matrix, durch vaskuläre Zellproliferation, Zellmigration, durch eine Umgestaltung des Kollagens und die Entstehung einer In-Situ-Thrombose (Davis et al. 2003, Pullamsetti et al. 2010).

Abkürzungen:

CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2; **CCL5**: Chemokine (C-C motif) ligand 5

CX3CL1: Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (Fraktalkine); **CX3CR1**: Chemokine (C-X3-C motif) rezeptor 1; **EC**: Endothelzellen; **FB**: Fibroblasten; **FGF**: Fibroblast-Growth-Factor; **IL-1**: Interleukin 1; **IL-6**: Interleukin 6; **MCP 1**: Monocyte-chemotactic-protein 1; **PDGF**: platelet derived growth factor; **PAH**: pulmonary arterial hypertension; **SDF-1 α** : stromal cell-derived factor 1 α ; **SMC**: smooth muscle cells; **TNF α** : tumor necrosis factor α ; **Treg cells**: regulatory T cells; **VEGF**: vascular endothelial growth factor

1.6 Zellen der unspezifischen Abwehr

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der immunologischen Abwehr als antigenpräsentierende Zellen. Sie gehen aus Monozyten hervor und agieren als antigenprozessierende und antigenpräsentierende Zellen. Durch die Expression von Oberflächenrezeptoren bewirken sie eine Aktivierung von T-Zellen und somit des spezifischen Immunsystems.

In Studien von Perros et al. konnte gezeigt werden, dass es an Gefäßstellen mit plexiformen Läsionen bei PAH-Patienten zu einer vermehrten Ansammlung und Infiltration von dendritischen Zellen kommt (Perros et al. 2007).

Makrophagen

Auch die Makrophagen gehen aus den Monozyten hervor und sind ebenfalls als antigenpräsentierende Zellen ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Abwehr.

Durch die Phagozytose von Antigenen kommt es zur Sekretion von Zytokinen. Des Weiteren prozessieren Makrophagen phagozytierte Antigene zu Peptidfragmenten, welche sie über die MHC-II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentieren. Diese Antigenpräsentation wird von den T-Zellen erkannt und initialisiert die Bildung spezifischer Antikörper. Weiterhin sezernieren Makrophagen nach Kontakt mit Antigenen Zytokine wie TNF- α oder IL-1- β .

Im Rahmen der PAH kommt es zu einer Makrophagenakkumulation im Bereich der Lungengefäße und vermutlich zu einer Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie MCP-1 und von Matrix Metalloproteasen, die eine Vasokonstriktion, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und eine Zunahme der Zellproliferation bewirken (Itho et al. 2006).

Mastzellen

Die Mastzellen zählen zu den Leukozyten und reifen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks heran. Im Zytoplasma der Mastzellen sind große Mengen an Histamin und Heparin in sogenannten Granula gespeichert.

Bei einer Mastzelldegranulation kommt es zur Freisetzung von proinflammatorisch wirksamen Zytokinen, Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen und Proteasen.

Des Weiteren sind Mastzellen ein Speicher für IL-4, ein Zytokin, welches unter anderem eine Aktivierung von autoimmunreaktiven B-Zellen bewirkt. Durch die Aktivierung dieser B-Zellen

Einleitung

werden Autoantikörper gebildet, wie zum Beispiel die Anti-Endothelzell-Antikörper.
Für den Prozess des pulmonalarteriellen Remodellings scheinen auch die Mastzellen eine bedeutende Rolle zu spielen (Banasova et al. 2008).

1.7 Zellen der spezifischen Abwehr

B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten zählen zu den Leukozyten und sind als einzige Zellen in der Lage Antikörper zu bilden. Nach Antigenkontakt differenzieren sich die B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche die Antikörper bilden.

T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten präsentieren zusammen mit den B-Lymphozyten die adaptive Immunantwort.

Man unterscheidet zwischen T-Helfer-Zellen, die durch einen CD-4-Rezeptor gekennzeichnet sind, zytotoxische T-Zellen mit einem CD-8-Rezeptor, T-Regulator-Zellen, T-Gedächtniszellen und natürlichen-Killer-T-Zellen.

T-Lymphozyten erkennen Antigene nur dann, wenn sie von antigenpräsentierenden Zellen mittels der sogenannten MHC-Restriktion vorgezeigt werden.

T-Helferzellen sezernieren verschiedene Zytokine und können noch einmal dahingehend aufgeteilt werden, ob diese Zytokine an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, oder ob sie eine Immunantwort der B-Lymphozyten stimulieren.

Daley et al. konnten zeigen, dass das von T-Helfer-Zellen sezernierte Interleukin-13 den Muskularisierungsgrad in pulmonalen Arterien zu verstärken scheint (Daley et al. 2008).

Zytotoxische T-Zellen sind in der Regel durch CD-8-Heterodimere an ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet. Sie erkennen über MHC-I präsentierte Antigene.

Sie lösen über eine Induktion der Signalwege in der defekten Zelle den physiologischen Zelltod aus.

Austin et al. haben herausgefunden, dass es eine Anhäufung von CD-8-T-Lymphozyten in den peripheren Lungen von PAH-Patienten gibt (Austin et al. 2009).

Die T-Regulator-Zellen (T reg) haben ihre Aufgabe in einer koordinierenden Funktion in Hinsicht auf die Immunantwort. So unterstützen sie Reaktionen gegen Krankheitserreger und andere Antigene und unterdrücken auf der anderen Seite überschießende Immunantworten, die eine Autoimmunität gegen körpereigene Zellen und Gewebe hervorrufen könnten.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Patienten mit PAH eine höhere Konzentration an zirkulierenden T-Regulator-Zellen haben als gesunde Kontrollprobanden (Ulrich et al. 2008).

1.8 Fragestellung

Verschiedene Studien und Untersuchungen haben gezeigt, dass eine enge Verbindung zwischen Immunprozessen, inflammatorischen Mechanismen und der Entstehung und Entwicklung verschiedener Formen der PAH besteht.

In bis zu 40% der Fälle können bei diesen Patienten zirkulierende Autoantikörper mit antinukleären Antikörpern entdeckt werden (Isern et al. 1992). Erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) und P-Selectin wurden ebenfalls in diesen Patientengruppen gemessen.

Der Einfluss von inflammatorischen Mechanismen auf die Entwicklung der PAH ist weiterhin dadurch verdeutlicht, dass bei betroffenen Patienten eine erhöhte Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wie Fraktalkin (CX3CL1), CCL2 (MCP-1) und CCL5 (RANTES) in pulmonalen Gefäßen vorliegt. Eine Assoziation dieser Zytokine und Chemokine mit inflammatorischen Zellinfiltraten sind bei schweren Formen der PAH beschrieben.

Tuder et al. beschrieben Infiltrationen von inflammatorischen Zellen im Bereich von plexiformen Gefäßläsionen pulmonaler Gefäße bestehend aus B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen (Tuder et al. 1994).

Aktuelle Studien von Perros et al. konnten eine Ansammlung von Dendritischen Zellen im Bereich plexiformer Gefäßläsionen bei Patienten mit PAH oder auch bei experimentell provozierter pulmonaler Hypertonie (Perros et al. 2007).

Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen von CD4- und CD25-positiven T-Regulatorzellen bei PAH-Patienten gefunden, die auch eine Bedeutung der T-Regulatorzellen für die Pathogenese der PAH annehmen lassen.

Somit haben die meisten veröffentlichten Studien die Präsenz von inflammatorischen Zellinfiltraten im Bereich der pulmonalen Gefäße bei PAH-Patienten gezeigt.

Eine genaue quantitative Verteilung oder genauere Proportionen von Immun- und Entzündungszellen im Bereich der veränderten pulmonalarteriellen Gefäße ist bislang jedoch noch nicht genau erforscht worden.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war, das Vorkommen und die Verteilung von Immunzellen und Entzündungszellen im Bereich von Lungengefäßen beim Krankheitsbild der PAH detailliert zu verifizieren.

In der vorliegenden Studie wurde systematisch das quantitative Vorkommen und die Verteilung von Immunzellen und inflammatorischen Zellen in humanem Lungengewebe von Patienten mit PAH im Stadium NYHA III und IV ausgewertet.

Wir untersuchten hierzu verschiedene Größenkategorien von Pulmonalarterien, nachdem eine histomorphologische Charakterisierung der PAH in humanem Lungengewebe erfolgt war.

In der Studie wurden die genannten Kriterien bei Makrophagen, Mastzellen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen, sowie regulatorischen T-Zellen untersucht. Für die qualitative und quantitative Analyse der Entzündungs- und Immunzellen erfolgte die Etablierung verschiedener immunhistologischer Antikörperfärbungen.

Zusammenfassend sollte diese Arbeit folgende Ziele erreichen:

- eine histologische Charakterisierung von humanem PAH Lungengewebe
- die Etablierung von immunhistochemischen Färbungen für verschiedene Antikörperfärbungen, um ausgewählte Immunzellen und inflammatorische Zellen in Lungengewebeproben optisch darzustellen
- eine qualitative und quantitative Analyse von Immunzellen und inflammatorischen Zellen in kompletten Lungengewebs-Schnitten
- eine systematische Analyse von inflammatorischen Zellen und Immunzellen im Bereich pulmonalarterieller Gefäße, die nach ihrem Durchmesser in verschiedene Größenkategorien eingeteilt wurden (20-50 μm , 51-150 μm , > 150 μm)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien:

Substanz	Hersteller
Ethanol 70%, 96%, 99,6%	Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Formaldehyd, säurefrei $\geq 37\%$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylolersatz (Rotihistol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pikrinsäure wässrig	Fluka, Buchs, Schweiz
Eindeckmedium, xylollöslich (Pertex)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Isopropylalkohol 99,8%	Fluka, Buchs, Schweiz
Eosin-y-alkoholisch	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Material und Methoden

2.1.2 Reagenzien

Name des Reagenz	Hersteller
Trypsin Konzentrat + Diluent	Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA
Avidin-Biotin-Blocking KIT	Vector/ Linaris, Wertheim, Deutschland
Normal Horse Serum	Alexis, Grünberg, Deutschland
ImmPRESS Reagent Anti-Mouse KIT	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Nova Red	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Hämatoxylin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vector VIP Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim, Deutschland
DAB Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kits Anti-Mouse, Anti-Rabbit	Vector/ Linaris, Wertheim, Deutschland
Toluidin Blau 1%	Sigma, München, Deutschland

Tabelle 4: verwendete Reagenzien

2.1.3 Lösungen und Puffer:

Lösung	Zusammensetzung:
<u>PBS-Puffer / 10 x konzentriert</u>	1,37M NaCl 0,027M KCl 0,065M Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 0,015M KH ₂ PO ₄ in 900 ml Aqua dest. lösen
<u>PBS-Puffer / 1x konzentriert</u>	1 L PBS / 10 x konzentriert 9 L Aqua dest. pH = 7,40 einstellen
<u>BSA 10%</u> (Albumin bovine Fraction V)	3*10 ⁻⁴ M BSA 2 mM Natriumazid 200ml PBS/ 1x konzentriert

Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen

2.1.4 Antikörper

Name des Antikörpers	Hersteller
Mouse-Anti-Human CD 3	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Mouse-Anti-Human CD 8	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Purified-Anti-Human FOXP3	Bio Legend, San Diego, CA, USA
Mouse-Anti-Human CD 68	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Mouse-Anti-Human CD 209	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
Anti- α smooth muscle actin Mouse-Anti-Human (Clone 1A4)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-von-Willebrand Faktor Rabbit-Anti-Human	Dako, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6: verwendete Antikörper

2.2 Histologie, Immunhistologie

2.2.1 Gebrauchsmaterialien:

Material	Hersteller
Parafilm	Brand, Wertheim, Deutschland
Deckgläser, versch. Größen	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträger (Superfrost Plus)	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Universaleinbettkassetten	Sakura, Heppenheim, Deutschland
Mikrotomklingen S 35	Feather, Japan

Tabelle 7: verwendete Gebrauchsmaterialien

2.2.2 Geräteliste:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Rotationsmikrotom, vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140 H	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150 C	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	CTP 1050	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop, Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300 F	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

Tabelle 8: verwendete Geräte

2.3 Methoden

2.3.1 Versuchsgenehmigung und Patienteneinverständnis

Für die vorliegende Studie wurde humanes Lungengewebe verwendet, welches im Rahmen von Lungentransplantationen gewonnen wurde.

Es wurde Gewebe von jeweils zehn verschiedenen Patienten mit einer PAH und zehn lungengesunden Patienten verwendet.

Das Studienprotokoll für die Gewebeentnahmen wurde durch die Ethikkommission am Fachbereich Humanmedizin der Justus Liebig Universität Gießen in Übereinkunft mit dem nationalen Gesetz und den „*Good clinical practice/ International conference on harmonisation*“ *Guidelines* genehmigt.

Eine schriftliche Zustimmung wurde von jedem Patienten oder Betreuer eines Patienten eingeholt und ist unter dem Aktenzeichen AZ 31/93 einzusehen.

Es erfolgten pathologische und histopathologische Untersuchungen von allen gewonnenen Lungengeweben.

Die Gewebe der PAH-Patienten konnten ihrem histologischen Befund nach den Gruppen III-IV der abgewandelten NYHA-Klassifikation zugeteilt werden.

Geschlecht	Alter	mPAP (mmHg)	CI (l/min/m ²)	NYHA Klasse
weiblich	43	70	1,2	II-III
männlich	26	44	2,4	III
weiblich	31	82	2,1	III-IV
weiblich	45			
weiblich	17	114		III-IV
weiblich	24	73	1,56	III
männlich	34	62	2,79	II-III
männlich	49			
männlich	35	23	1,98	III
männlich	58	60	1,6	II-III

Tabelle 9: Physiologische Daten der PAH-Patienten

Material und Methoden

Des Weiteren wurde Lungengewebe von 10 gesunden Probanden gewonnen, welche keines der Kriterien, die per Definitionem für eine PAH sprechen, erfüllten.

2.3.2 Gewebegewinnung

Die explantierten Lungen wurden sofort nach der Entnahme mit eiskalter PBS-Pufferlösung durchgespült.

Die Gewebeproben für die Immunhistochemie wurden in Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd gegeben und für 24 Stunden bei 4°C fixiert.

Im weiteren Verlauf wurden die Gewebeproben über Nacht in einem Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert (Tissue Processor ASP200; Leica, Heidelberg, Germany).

Anschließend wurden die Gewebeproben in Paraffin gegossen.

Mit einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf positiv geladene Objektträger aus Glas (Superfrost Plus) gegeben und anschließend getrocknet.

Es erfolgten nun Färbungen der Schnitte mit Eosin/Hämatoxylin (H/E) für die histomorphologische Auswertung. Jegliche immunhistochemische Färbungen wurden mit speziellen, zellspezifischen Antikörpern durchgeführt.

2.3.3 Histomorphologie

Um das histomorphologische Erscheinungsbild der pulmonalen Arterien in den Gewebeschnitten der PAH-Lungen genauer beurteilen und analysieren zu können, wurden spezielle Färbungen durchgeführt.

Zunächst wurden mit den angefertigten histologischen Lungenschnitten Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin (H/E) angefertigt, um durch histomorphologische Analysen das Erscheinungsbild gesunden Lungengewebes von dem an PAH erkranktem Lungengewebe differenzieren zu können.

Hierzu wurden Lungenschnitte von gesunden Donor-Lungen (n = 10) und Lungenschnitte von PAH-Patienten (n = 10) nach einem standardisiertem Protokoll gefärbt.

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurde nach dem in Tabelle 10 aufgeführten Färbeprotokoll vollzogen.

Material und Methoden

Nr.	Inkubationsdauer in min.	Reagenz
1	10	Rotihistol
2	10	Rotihistol
3	5	Rotihistol
4	5	Ethanol absolut 99,6%
5	5	Ethanol absolut 99,6%
6	5	Ethanol 96%
7	5	Ethanol 70%
8	2	Aqua dest.
9	20	Hämalaun nach Mayer, sauer
10	5	H ₂ O →> fließend
11	1	Ethanol 96%
12	4	Eosin-y-alkoholisch
13	abspülen	Aqua dest.
14	2	Ethanol 96%
15	2	Ethanol 96%
16	5	Ethanol absolut 99,6%
17	5	Isopropylalkohol 99,8%
18	5	Rotihistol
19	5	Rotihistol
20	5	Xylol
21		Eindecken mit Pertex Balsam

Tabelle 10: Färbeprotokoll Hämatoxylin/Eosin

2.3.4 Immunhistochemie

Vor Durchführung einer immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

Es folgt ein Erhitzen der Schnitte im Brutschrank bei 58°C für 20 Minuten.

Anschließend werden die Schnitte in Xylol entparaffiniert.

Eine Rehydrierung erfolgt in der absteigenden Ethanolreihe.

Die endogene Peroxidase wird mit H₂O₂ 30% in Methanol gehemmt. Dies führt zu einer Reduktion des Hintergrundsignals bei der Farbentwicklung.

Anschließendes Waschen in Leitungswasser und PBS.

Im nächsten Schritt wird eine Protease verwendet, um die Gewebematrix teilweise zu verdauen und so das Antigen im Gewebe freizulegen, die sogenannte Demaskierung der Epitope. Hierfür wird Trypsin auf die Schnitte gegeben und bei 37° C für 20 Minuten inkubiert.

Daraufhin gründliches Waschen in PBS.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, wird ein Proteinblock mit Serum durchgeführt (2,5% normal Horse Serum, ImmPRESS Reagent Kit, Vector Laboratories).

Es folgt das Aufbringen des Primärantikörpers in entsprechender Konzentration (z.B. 1:100 in 10% BSA) und die Inkubation über Nacht bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag werden die Schnitte zunächst gründlich für zwei Stunden in PBS gewaschen.

Die Detektion des Antikörpers erfolgt durch den Sekundärantikörper Anti mouse Ig Peroxidase (ImmPRESS Reagent Kit, Vector Laboratories).

Die Peroxidase wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach erneutes, gründliches Waschen der Schnitte in PBS.

Nach dem Waschen wird das Substrat aufgebracht, Nova Red (Vector Laboratories).

Im Anschluss gründliches Waschen der Schnitte in Leitungswasser und a.d.

Die Färbung der Schnitte erfolgt mit Hämatoxylin.

Das anschließende Bläuen geschieht durch kurzes Waschen in Leitungswasser, PBS und a.d.

Zum Abschluss werden die Schnitte mit Pertex Balsam eingedeckt.

Material und Methoden

Nr.	Inkubationsdauer in Minuten	Reagenz:	Anmerkung:
	20	Brutschrank 58°C	
1	10	Xylol	
2	10	Xylol	
3	10	Xylol	
4	5	Ethanol absolut 99,6 %	
5	5	Ethanol absolut 99,6 %	
6	5	Ethanol 96 %	
7	5	Ethanol 70 %	
8	20	H ₂ O ₂ -Methanol-Gemisch	100 ml Methanol reinst + 100 ml H ₂ O ₂ 30 %
9	2x5	Aqua dest.	
10	2x5	PBS	
11	15	Trypsin (37°C)	0,5 ml Trypsin+1 ml Diluent
12	2x5	PBS	
13	60	10 % BSA	100 µl / Schnitt
14	2x5	PBS	
15	20	Serumblock I	2,5 % Normal Horse Serum ImmPRESS Kit Anti-Maus Ig Peroxidase
16	über Nacht	Primärantikörper I	mit 10 % BSA verdünnen
17	4x5 / 2 Std.	PBS	
18	30	Sekundärantikörper	ImmPRESS Kit Anti-Maus Ig Peroxidase
19	3x5	PBS	
20	5 bis 15	Nova-Red Substrat	
21	5	Leitungswasser	
22	1	Aqua dest.	
23	1 bis 3	Hämatoxylin	
24	spülen	Leitungswasser	
25	ca. 30 Sek.	PBS	
26	1	Aqua dest.	
27	2	Ethanol 96 %	

Material und Methoden

28	2	Ethanol 96 %	
29	5	Isopropylalkohol	
30	5	Isopropylalkohol	
31	5	Rotihistol I	
32	5	Rotihistol II	
33	5	Xylol	
34		Eindecken mit Pertex	

Tabelle 11: Färbeprotokoll Antikörperfärbungen

Alle Antikörperfärbungen wurden nach diesem etablierten Protokoll durchgeführt und unterscheiden sich lediglich in der benötigten Konzentration des Antikörpers voneinander.

Antikörper	Zelltyp	Konzentration des Antikörpers
CD 68	Makrophagen	1/100
CD 209	dendritische Zellen	1/10
CD 3	T-Lymphozyten	1/10
CD 8	T-Lymphozyten	1/10
FOXP3	regulator. T-Zellen	1/10
α -smooth-muscle actin	glatte Muskelzellen	1/900
von-Willebrand-Factor	vWF (Endothel)	1/900

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Antikörperkonzentrationen

2.3.5 Mastzellfärbung

Für eine optische Differenzierung der Mastzellen innerhalb des humanen Lungengewebes wurde eine histochemische Färbung mit Toluidin Blau etabliert.

Nach erfolgter Entparaffinierung und anschließender Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte für 2-3 Minuten in einer Lösung mit

1 %igem Toluidin Blau, pH = 2,2 (Sigma, München, Deutschland) inkubiert. Nach der Färbung mit Toluidin Blau 1 % wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Im Anschluß erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe mit 96 % - 99,6 %igem Ethanol für jeweils 20-30 Sekunden. Zum Schluß wurden die gefärbten Schnitte in Xylol gegeben und abschließend mit Pertex-Balsam eingedeckt.

2.3.6 Gefäßmorphometrie

Um das histomorphologische Erscheinungsbild der pulmonalen Arterien in den Gewebeschnitten der PAH-Lungen genauer beurteilen und analysieren zu können, wurden spezielle Färbungen durchgeführt.

Lungengewebe von gesunden Donoren (n = 10), sowie von PAH-Patienten (n = 10) wurden wie weiter oben beschrieben für die morphologische Analyse histochemisch mit Eosin und Hämatoxylin gefärbt.

Eine immunhistochemische Doppelfärbung erfolgte mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Alpha-Actin und von Willebrand-Faktor (Faktor VIII).

Die Schritte der immunhistochemischen Doppelfärbung erfolgten prinzipiell wie im vorangegangenen Abschnitt bereits beschrieben. Auch hier wurde die Demaskierung der Epitope durch eine Proteolyse mit Trypsin durchgeführt. Der Antikörper gegen glattmuskuläres Alpha-Actin (clone 1A4, Sigma) wurde für die Färbung mit einer Konzentration von 1/900 verdünnt.

Durch diesen Färbevorgang konnte die Tunica media der pulmonalarteriellen Gefäße hervorgehoben werden.

Der Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor wurde für die Färbungen ebenfalls im Verhältnis 1/900 verdünnt. Hierdurch wurde das Endothel in Gefäßen angefärbt.

Die Inkubationszeit der beiden beschriebenen Primärantikörper betrug jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die abschließende Detektion wurde mit Avidin-Biotin-Peroxidase-basierten ABC KITs von Vectastain umgesetzt. Zur visuellen Differenzierung wurde für die Alpha-Actin-Färbung Vector VIP (violette Färbung) als Chromogen verwendet und für die von-Willebrand-Färbung DAB (3,3'-Diaminobenzidin, braun).

Material und Methoden

Im Anschluß an die Doppelfärbung wurde die morphometrische Analyse der Lungengefäße mit Hilfe eines computergestützten Analysesystems und speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros (Leica Q Win Standard Analyzing Software) durchgeführt.

Durch diese Färbemethoden konnten nicht-muskularisierte Gefäße durch die braune endotheliale anti-von Willebrand Faktor Färbung deutlich gemacht werden. Sie konnten so unterschieden werden von muskularisierten oder teil-muskularisierten Gefäßen, welche durch die anti-Alpha-Actin Färbung violett gefärbt waren.

Mit Hilfe der Analyse-Software konnten so muskularisierte Gefäßwandbereiche von nicht-muskularisierten Gefäßwandbereichen durch eine kolorimetrisch- spektrometrische Analyse unterschieden werden.

Des Weiteren wurden die pulmonalen Arterien nach ihrem äußeren Gefäßdurchmesser kategorisiert. Dies erfolgte ebenfalls mit Hilfe des computergestützten Analysesystems der Firma Leica.

Die Gefäße wurden in drei Kategorien eingeteilt:

Kategorie 1: pulmonale Arterien mit einem Durchmesser von 20-50 μm

Kategorie 2: pulmonale Arterien mit einem Durchmesser von 51-150 μm

Kategorie 3: pulmonale Arterien mit einem Durchmesser > 150 μm

2.3.7 Positiv- und Negativkontrollen

Für jeden Antikörper wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Für Positivkontrollen wurden Gewebe verwendet, von denen bekannt war, dass sie die jeweiligen Antigene enthielten. Für die Negativkontrollen wurde während des Färbevorgangs kein Primärantikörper verwendet.

2.3.8 Zellzählung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, eine genaue Aussage über das qualitative und quantitative Vorkommen von Immun- und Entzündungszellen in PAH Lungengewebe und im Bereich der pathologisch veränderten pulmonalarteriellen Gefäße treffen zu können. Hierzu war es nötig, die Auswertung eines gesamten Lungenschnittes vorzunehmen. Zum einen wurde das gesamte Gewebe des Schnittes ausgewertet, und zum anderen separat die Bereiche unmittelbar um und in den Pulmonalarterien.

Jegliche Zellzählungen in den Lungenschnitten wurden immer vergleichend bei Donor-Lungen und PAH-Lungen durchgeführt.

Alle im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen positiv gefärbten Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, T-Zellen und T-Regulator-Zellen wurden zunächst in den gesamten Lungenschnitten der Donoren (n = 10) und der PAH-Lungen (n = 10) ausgezählt. Dies erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Leica Instruments, Nussloch, Germany) unter Zuhilfenahme eines mechanischen Einhandzählers.

Zum anderen wurden alle positiv gefärbten Zellen gezählt, welche sich in unmittelbarer Umgebung der pulmonalarteriellen Gefäße der Lungenschnitte von Donoren und PAH-Lungen befanden, sowie auch alle angefärbten Zellen in den verschiedenen Gefäßwandschichten.

Bei diesem Arbeitsschritt wurde folgende Anzahl an Gefäßen ausgezählt:

Makrophagen: CD 68; Donor = 538 Gefäße, PAH = 1070 Gefäße

Mastzellen: Toluidinblau; Donor = 476 Gefäße, PAH = 1125 Gefäße

dendritische Zellen : CD 209; Donor= 544 Gefäße, PAH = 982 Gefäße

T-Zellen: CD 3; Donor = 512 Gefäße, PAH = 1032 Gefäße

zytotoxische T-Zellen: CD 8; Donor = 512 Gefäße, PAH = 982 Gefäße

regulatorische T-Zellen: FOXP3; Donor = 888 Gefäße, PAH = 1032 Gefäße

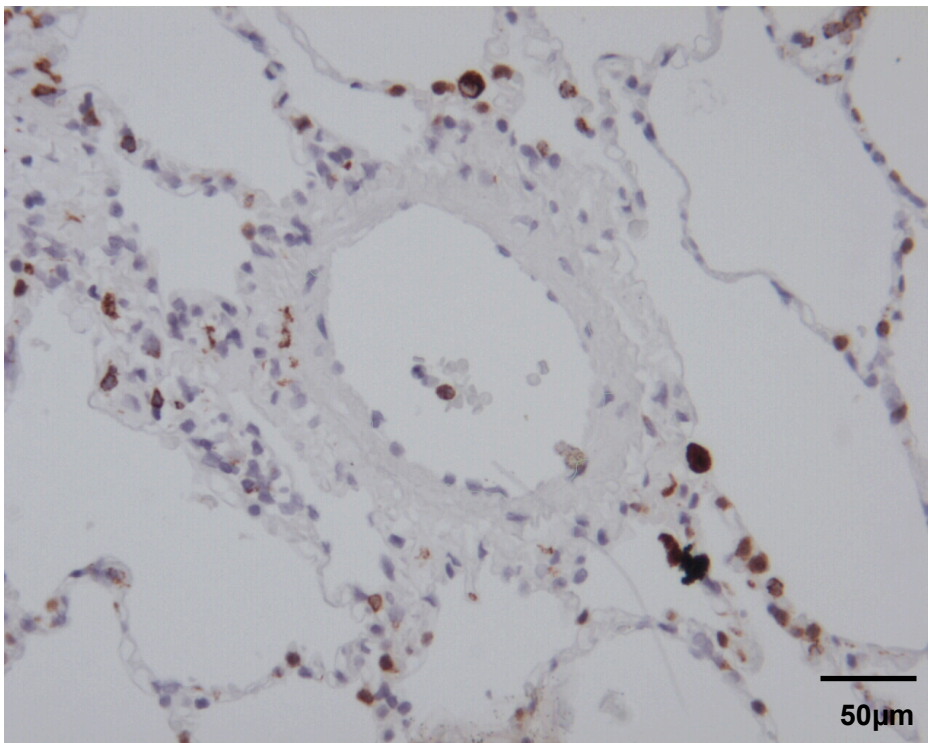


Abb. 3a: Perivaskulärbereich eines humanen Donor-Lungenschnittes; Färbung mit CD 68.
Scale bar 50 µm

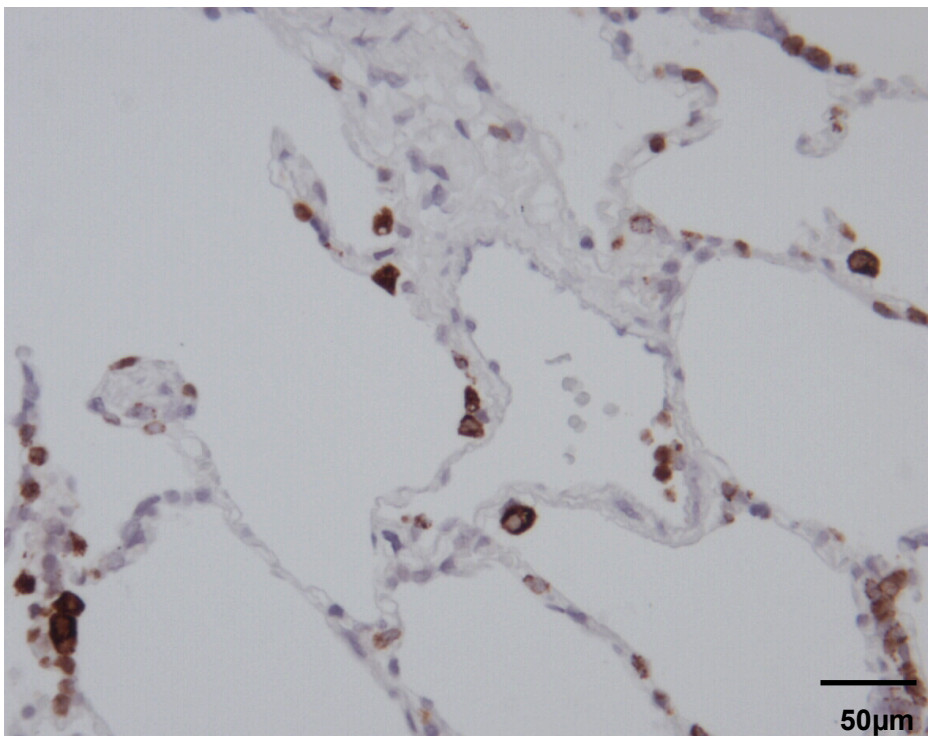


Abb. 3b: Perivaskulärbereich einer humanen Donor-Lunge Färbung mit CD 68.
Scale bar 50 µm

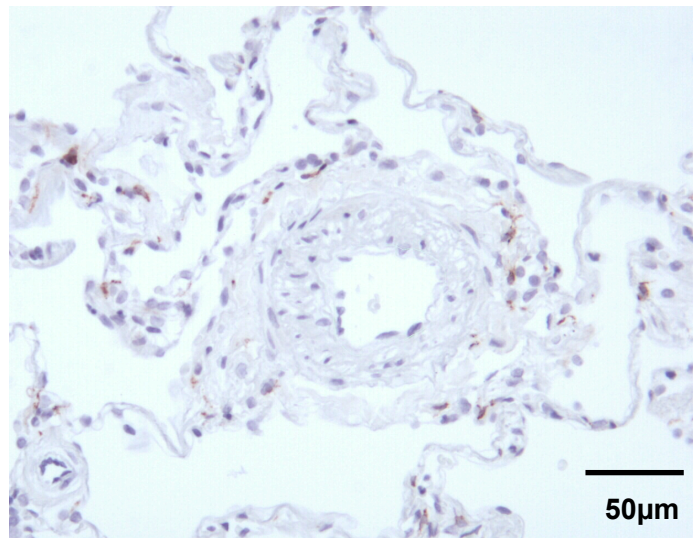


Abb. 3c: Perivaskulärbereich eines humanen PAH-Lungenschnittes; Färbung mit CD 209. Scale bar 50 μm

Die Werte der positiv gefärbten Zellen, welche im gesamten Gewebe der histologischen Lungenschnitte ausgezählt wurden, wurden jeweils berechnet für eine Gewebefläche von 100 mm^2 Lungengewebe mit Hilfe der Q Win Software von Leica. Durch die Umrechnung der Anzahl gefärbter Zellen auf eine Gewebefläche von 100 mm^2 wurde eine gute Vergleichbarkeit der errechneten Werte erzielt.

Die positiv gefärbten Zellen, welche in der unmittelbaren Umgebung der Lungengefäße oder innerhalb der Gefäßwandschichten gezählt wurden, wurden zusätzlich gesondert erfasst. Ihre Anzahl wurde der Lokalisation entsprechend, den verschiedenen Kategorien von Gefäßgrößen zugeordnet ($20\text{-}50 \text{ }\mu\text{m}$, $51\text{-}150 \text{ }\mu\text{m}$, $> 150 \text{ }\mu\text{m}$).

2.3.9 Statistische Auswertung

Die graphischen und statistischen Auswertungen wurden alle erstellt mit Hilfe der Computer Software GraphPad Prism 5, San Diego, Kalifornien, USA.

Die statistische Signifikanz der Unterschiede verschiedener Variablen zweier Gruppen wurde überprüft durch die Anwendung des T-Tests mit Welch Korrektur.

3. Ergebnisse

3.1 Überblick:

Das Leitthema dieser Studie war die qualitative und quantitative Analyse des Vorkommens von Inflammations- und Immunzellen in PAH Lungengewebe und in der unmittelbaren Umgebung pulmonalarterieller Gefäße. Für diese Untersuchungen wurde stets der direkte Vergleich zwischen gesundem Lungengewebe und PAH Lungengewebe durchgeführt.

Zunächst erfolgten histochemische Färbungen der Lungenschnitte mit Hämatoxylin und Eosin, um eine histomorphologische Differenzierung zwischen gesunden und PAH Lungen machen zu können. Durch die Hämatoxylin und Eosin Färbungen konnte der stattgehabte Prozess des pulmonalarteriellen Remodellings gut veranschaulicht werden.

Im nächsten Schritt wurde eine Gefäßmorphometrie durchgeführt. Hierzu wurden die Lungenschnitte einer immunhistochemischen Doppelfärbung mit Antikörpern gegen von Willebrand Faktor und gegen glattmuskuläres Alpha Actin unterzogen. Durch diese Färbungen gelang es zum einen die Tunica media von muskularisierten Gefäßen optisch darzustellen, und zum anderen die endothelialisierten Bereiche der Gefäße zu visualisieren.

Anhand dieser Färbungen konnte eine morphometrische Analyse der Lungengefäße durchgeführt werden. Es wurden die pulmonalarteriellen, muskularisierten Gefäße von den venösen unterschieden und vermessen. Hierbei erfolgte die Einteilung in drei Größenkategorien.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse erfolgte dann die Erhebung der Daten für das Vorkommen von Immunzellen in PAH Lungengewebe und in der unmittelbaren Umgebung der pulmonalarteriellen Gefäße. Hierzu wurden zunächst die Lungenschnitte als ganze ausgewertet und im Anschluß die Bereiche um die pulmonalarteriellen Gefäße herum.

3.2 Histomorphologisches Erscheinungsbild der PAH

3.2.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Um eine histomorphologische Differenzierung des Lungengewebes vornehmen zu können, wurde gesundes Lungengewebe und Lungengewebe von PAH-Patienten für die histologische Analyse zunächst histochemisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Durch diese Färbung konnte eine klare Unterscheidung der Donor- und PAH-Lungen erfolgen (Abb. 4a-f). Deutlich sichtbar war bei den PAH-Lungen eine Veränderung im Bereich aller drei Gefäßwandschichten (Intima, Media und Adventitia) durch das pulmonalarterielle Remodelling. Hierdurch kommt es zu einer starken Volumenzunahme in diesen drei Gefäßwandschichten. Im Bereich der Media beispielsweise führen eine Hyperplasie und eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen zur Verdickung dieser Schicht. Durch Proliferationen von Fibroblasten und eine Akkumulation von Matrixproteinen nimmt die Schicht der Adventitia an Volumen zu. Im Bereich der Intima kommt es zu Mikroläsionen im Rahmen der Entstehung der PAH. Diese Umbauvorgänge in allen Gefäßwandschichten der pulmonalarteriellen Gefäße bedingen eine Abnahme der Elastizität der Gefäße und eine Reduktion des Gefäßlumens und somit einen Anstieg des Gefäßwiderstandes.

Ergebnisse

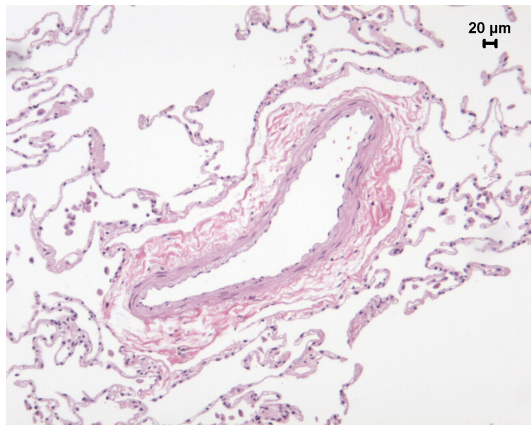


Abb. 4a: H/E-Färbung, Donor

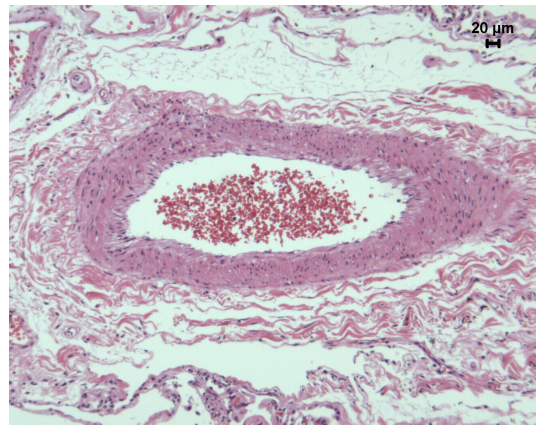


Abb. 4b: H/E-Färbung, PAH

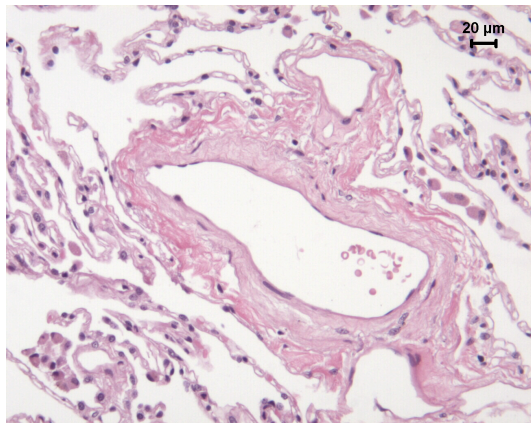


Abb. 4c: H/E-Färbung, Donor

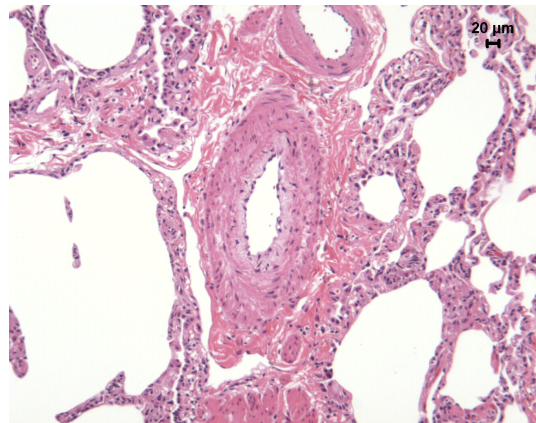


Abb. 4d: H/E-Färbung, PAH

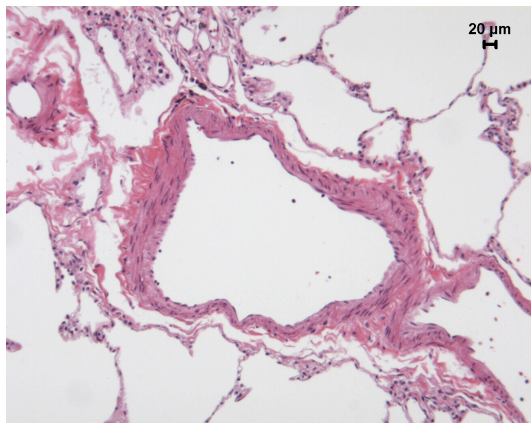


Abb. 4e: H/E-Färbung, Donor

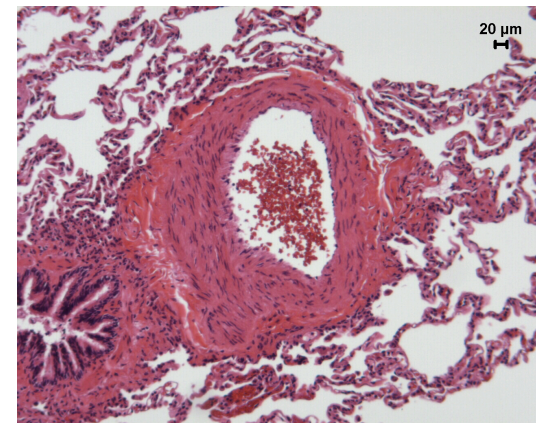


Abb. 4f: H/E-Färbung, PAH

Abb. 4 a-f: H/E-Färbung von Donor- und PAH-Lungengewebe. Scale bar = 20 µm

Zur weiteren histologischen Analyse der Lungenschnitte wurden diese immunhistochemisch mit Alpha-Actin- und von-Willebrand-Faktor-Antikörpern gefärbt. Diese Färbungen ermöglichten eine Unterscheidung zwischen arteriellen und venösen pulmonalen Gefäßen

3.2.2 Alpha-Actin-Färbung

Durch den Antikörper gegen glattmuskuläres Alpha-Actin konnten die muskularisierten Gefäßwandabschnitte optisch gut dargestellt werden. Es zeigte sich hier eine deutlich vermehrte Anfärbung von Alpha-Actin im Bereich pulmonalarterieller Gefäße bei PAH-Lungen im Vergleich zu Donor-Lungen. Dies bestätigte die Theorie des pulmonalarteriellen Remodellings. In den arteriellen Gefäßen der PAH-Lungen ist eine weitaus dickere muskuläre Schicht nachweisbar als in den Gefäßen gesunden Lungengewebes. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, veranschaulichte die Färbung die Hypertrophie und die Hyperplasie der glatten Muskelzellen in der Tunica media bei pulmonalarterieller Hypertonie.

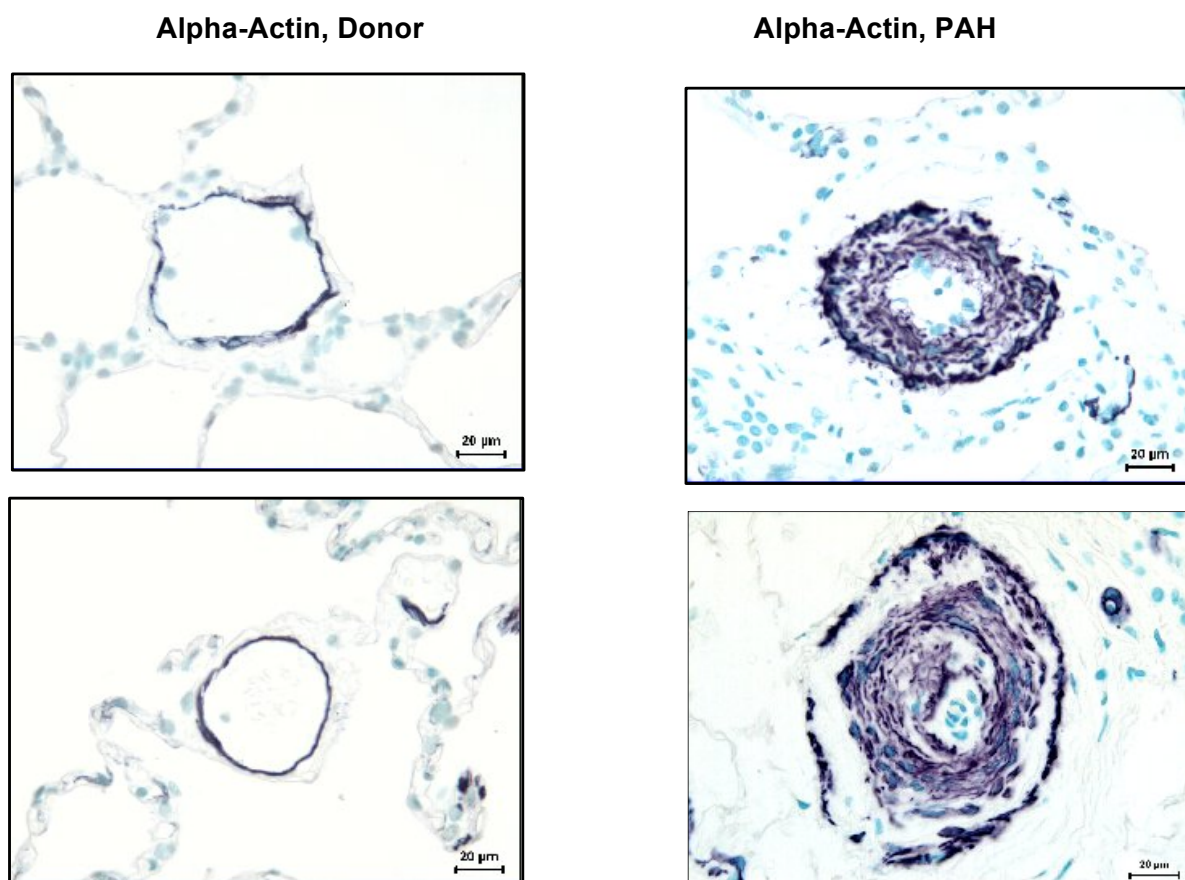


Abb. 5: Alpha-Actin-Färbung von Donor-Lungen und PAH-Lungen. Scale bar = 20 µm

3.2.3 Von Willebrand-Färbung

Der Antikörper gegen von Willebrand Faktor färbte die endothelialen Bereiche der pulmonalarteriellen Gefäße, und somit die Intima, an. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gefäßen in gesunden und PAH-Lungen (siehe Abb. 6). In PAH-Lungen war auch im Bereich der Intima eine Zunahme der Schichtdicke zu verzeichnen, was bedingt ist durch eine vermehrte Anlagerung von Endothelzellen im Bereich der für die PAH typischen vaskulären Mikroläsionen.

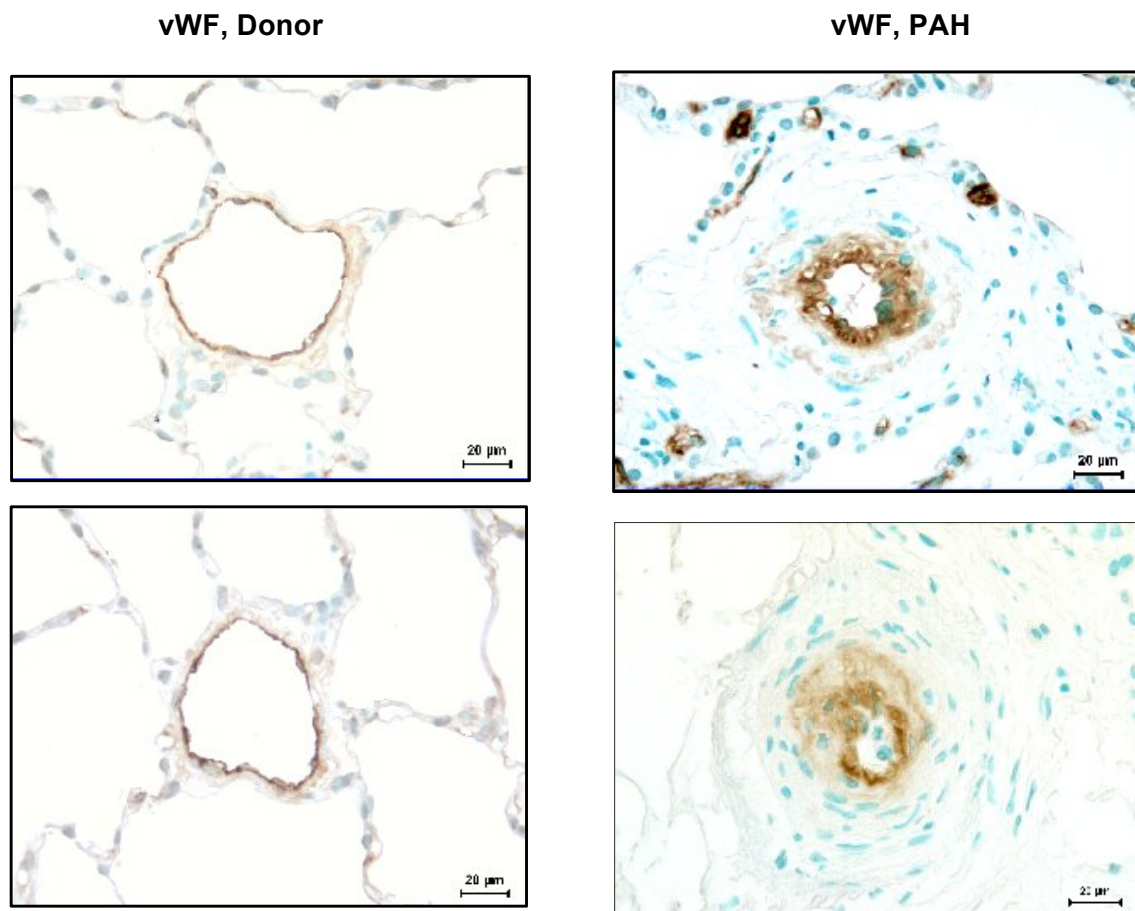


Abb. 6: von Willebrand Faktor-Färbung von Donor-Lungen und PAH-Lungen. Scale bar = 20 µm

3.2.4 Alpha-Actin- und von Willebrand-Doppelfärbung

In einer immunhistochemischen Doppelfärbung wurden die Lungenschnitte gleichzeitig mit dem Antikörper gegen glattmuskuläres Alpha-Actin und gegen von Willebrand Faktor gefärbt, wie in Abbildung 7 dargestellt.

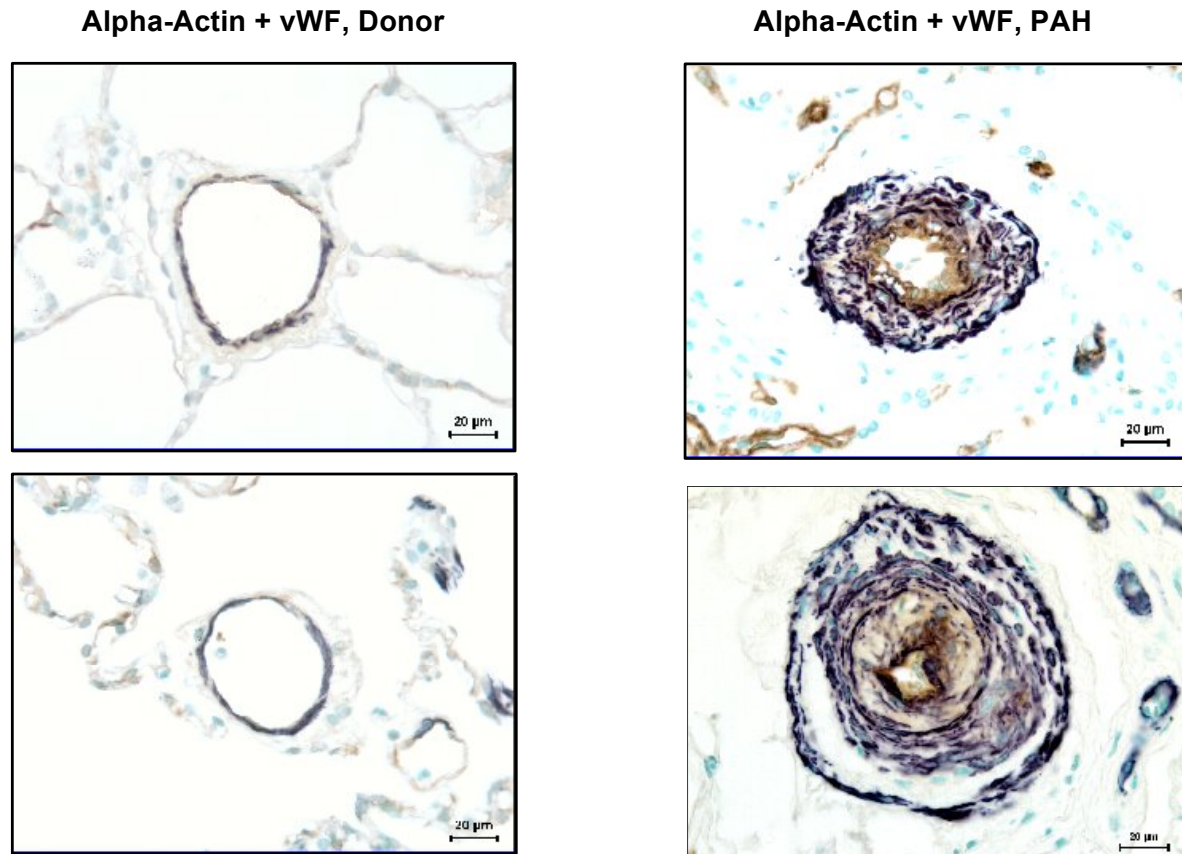


Abb. 7: Alpha-Actin- und von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung von Donor-Lungen und PAH-Lungen. Scale bar = 20 μm

3.3 Analyse von inflammatorischen Zellen und Immunzellen in Schnitten von gesunden Lungen und PAH Lungen

In den nächsten Schritten erfolgte in dieser Studie die qualitative und quantitative Analyse von verschiedenen Immunzellen und Inflammationszellen in Lungengewebe. Genauer wurde mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen der Nachweis von Mastzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen erbracht. Es wurde jeweils zunächst der gesamte Lungenschnitt ausgewertet und im nächsten Schritt der Perivaskulärbereich und die pulmonalen Gefäßwandschichten innerhalb der Lungenschnitte analysiert. Wie zuvor beschrieben erfolgte bei der Auswertung stets der Vergleich zwischen gesundem Lungengewebe und PAH-Lungengewebe.

3.3.1 Anzahl und Lokalisierung von Mastzellen

Der Nachweis, die Lokalisation und Quantifikation von Mastzellen im Lungengewebe wurde mit Hilfe einer Färbung mit Toluidin-Blau erbracht. Humane Lungenschnitte von gesunden Donor-Lungen und von PAH-Lungen wurden wie bereits weiter oben beschrieben mit einer Toluidin-Blau-Lösung gefärbt.

Nur eine sehr geringe Anzahl von Mastzellen konnte im peripheren Lungengewebe und in den Alveolen von pulmonal gesunden Probanden nachgewiesen werden (Abb. 8a). Im Gegensatz hierzu konnte ein zahlreiches Vorkommen von Mastzellen in PAH-Lungengewebe detektiert werden (Abb. 8b).

Ergebnisse

Lungengewebe

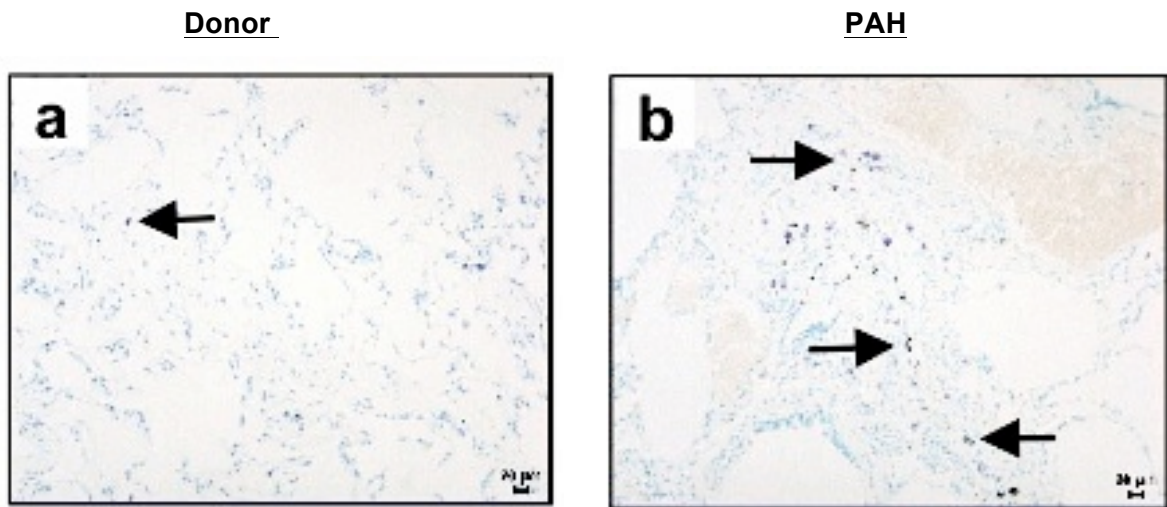


Abb. 8a,b: Mastzellfärbung mit Toluidin-Blau im peripheren Lungengewebe einer Donor-Lunge (a) und einer PAH-Lunge (b). Scale bar = 20 µm

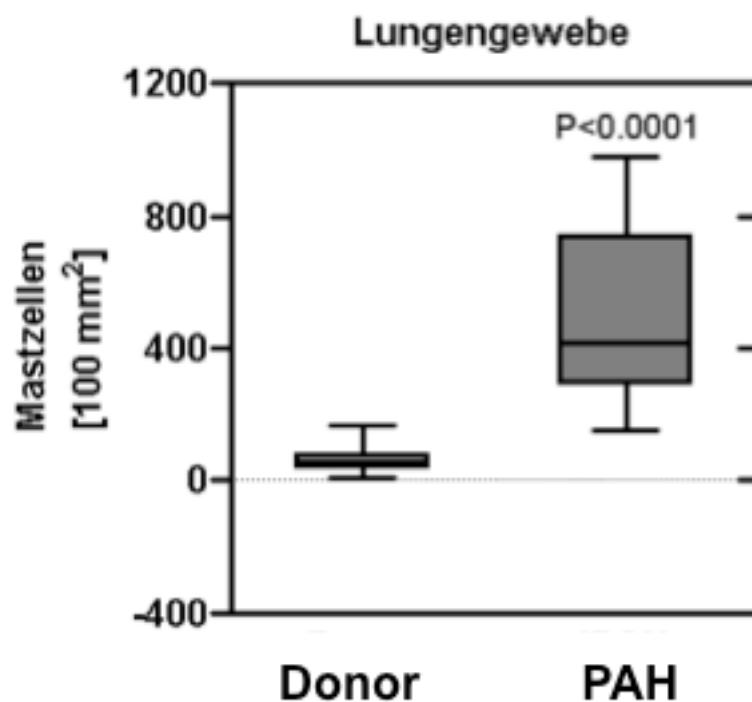


Abb. 9: Mastzellanzahl im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); $p < 0,0001$

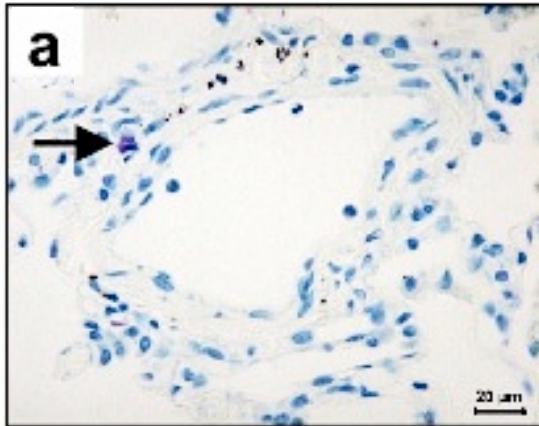
Lungenschnitte von Donor-Lungen hatten deutlich weniger Mastzellen (62 ± 8) (Mittelwert \pm Standardfehler) pro 100 mm² als Lungenschnitte von PAH Patienten (494 ± 65). Dieses Ergebnis zeigt einen signifikanten Anstieg der Zellzahlen ($p < 0,0001$).

Die Mehrzahl der vorkommenden Mastzellen traten im Bereich vaskulärer Läsionen auf.

Ergebnisse

Pulmonale Gefäße

Donor



PAH

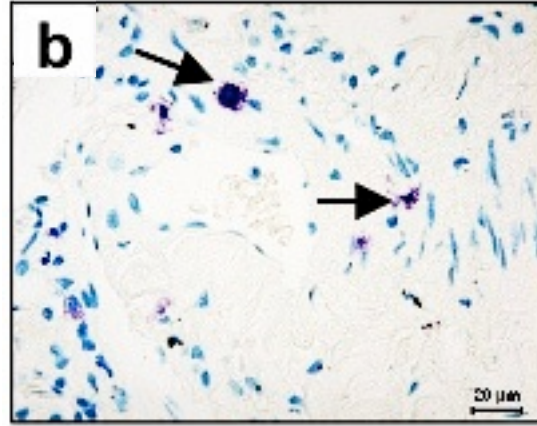


Abb. 10 a,b: Mastzellfärbung mit Toluidin-Blau im Bereich pulmonalarterieller Gefäße einer Donor-Lunge (c) und einer PAH-Lunge (d). Scale bar = 20 µm

Ergebnisse

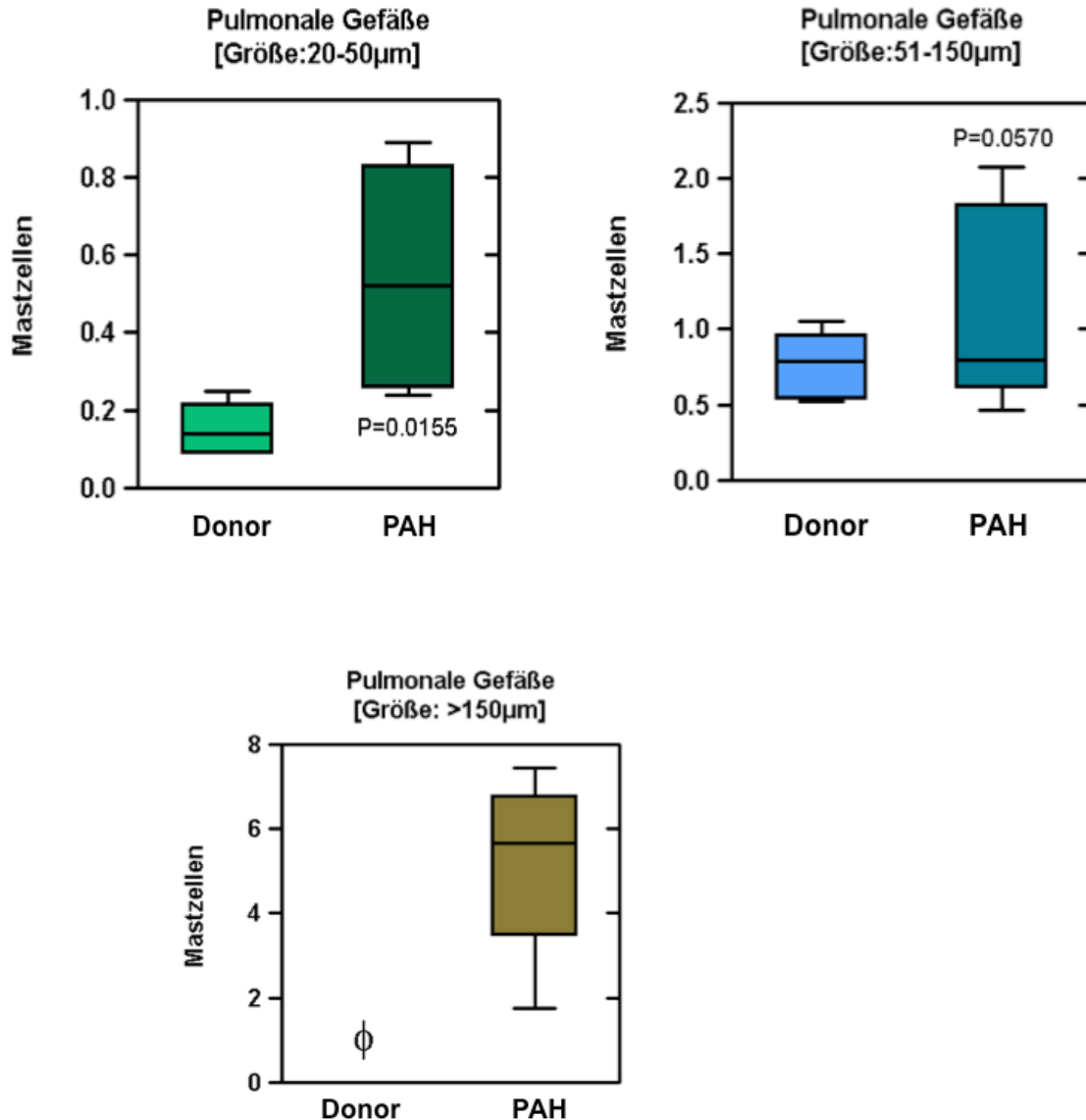


Abb. 11: Mastzellverteilung im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 µm; 51-150 µm; >150 µm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

Auch im Bereich der pulmonalarteriellen Gefäße konnten bei Lungenschnitten gesunder Probanden deutlich weniger angefärbte Mastzellen detektiert werden (siehe Abb. 10 a) als bei den Schnitten an PAH erkrankter Patienten (siehe Abb. 10 b).

Die Anzahl von Mastzellen in PAH-Lungengewebe war im Vergleich zu Lungengewebe gesunder Probanden in pulmonalarteriellen Gefäßen mit einem Durchmesser von 20-50 µm (Donor = $0,15 \pm 0,03$ Zellen; PAH = $0,54 \pm 0,13$ Zellen; $p = 0,0155$), ebenso in Gefäßen mit einem Durchmesser von 50-150 µm (Donor = $0,76 \pm 0,10$ Zellen; PAH = $1,14 \pm 0,30$ Zellen; $p = 0,0570$) erhöht (Abb. 10).

Ein deutlich gehäuftes Vorkommen von Mastzellen lag in Gefäßen mit einem Durchmesser von >150 µm vor (Donor = nicht nachweisbar; PAH = $5,24 \pm 0,95$ Zellen), (Abb. 11).

Kontrollfärbungen

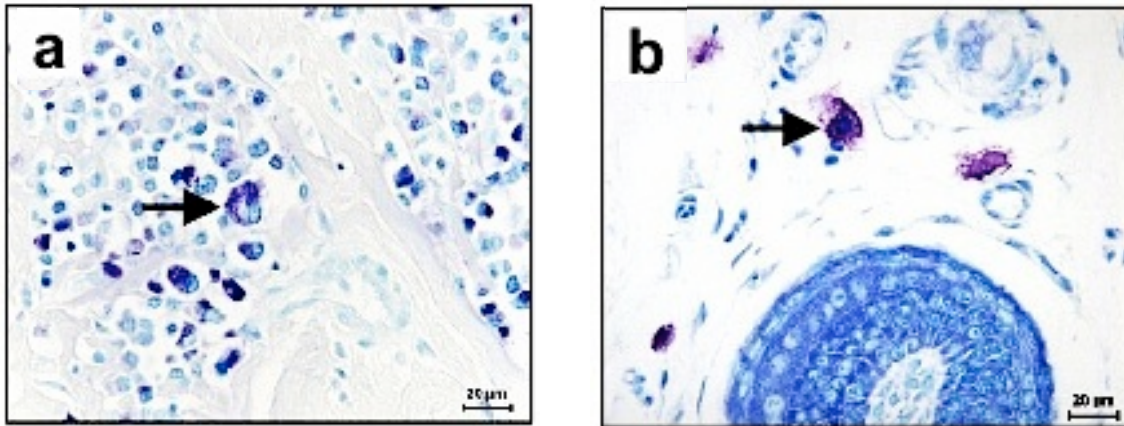


Abb. 12 a, b: Kontrolle der Brauchbarkeit der Mastzellfärbung, Färbung eines Mastzelltumors eines Hundes mit Toluidinblau (Abb. 12 a) und Färbung von Hautgewebe einer Ratte mit Toluidinblau (Abb. 12 b). Scale bar = 20 µm

Zunächst wurde Gewebe eines Mastzelltumors bei einem Hund mit Toluidinblau angefärbt, um zu zeigen, dass Mastzellen mit Toluidinblau anfärbbar sind. Anhand der deutlichen Färbung der Zellen, die morphologisch Mastzellen innerhalb des Tumorgewebes entsprechen, zeigt sich, dass die hier verwendete Färbung zur Mastzelldarstellung geeignet ist (Abb. 12 a).

Um zu sehen, ob die Färbung zwischen Mastzellen und anderen Zellen diskriminieren kann, wurde eine Färbung mit Toluidinblau von Hautgewebe einer Ratte durchgeführt. Bei der Betrachtung dieser Färbungen zeigen sich vereinzelt Mastzellen innerhalb der Haut (siehe Pfeil), andere Zellen zeigen keine eindruckliche Färbung, so dass anhand dieser Färbung gut zwischen Mastzellen und anderen Zellen unterschieden werden kann (Abb. 12 b).

3.3.2 Anzahl und Lokalisierung von Makrophagen

Für das Anfärben von Makrophagen wurden die Lungenschnitte mit einem Anti-Human CD 68 Antikörper gefärbt, welcher alle Isoformen des mit CD 68 Makrophagen assoziierten Antigens erkennt.

Die Auszählung der gefärbten Zellen in den gesamten Lungenschnitten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Gewebe gesunder Probanden (Abb. 13 a) und dem Gewebe von PAH Patienten (Abb. 13 b).

Ergebnisse

Lungengewebe

Donor

PAH

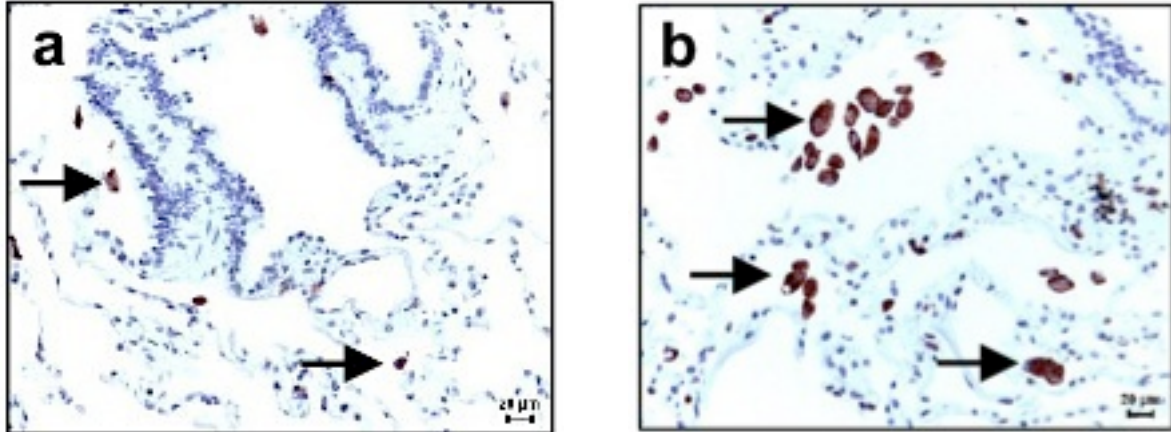


Abb. 13 a, b: CD 68-Färbung im peripheren Lungengewebe einer gesunden Lunge (a) und einer PAH-Lunge (b). Scale bar = 20 μ m

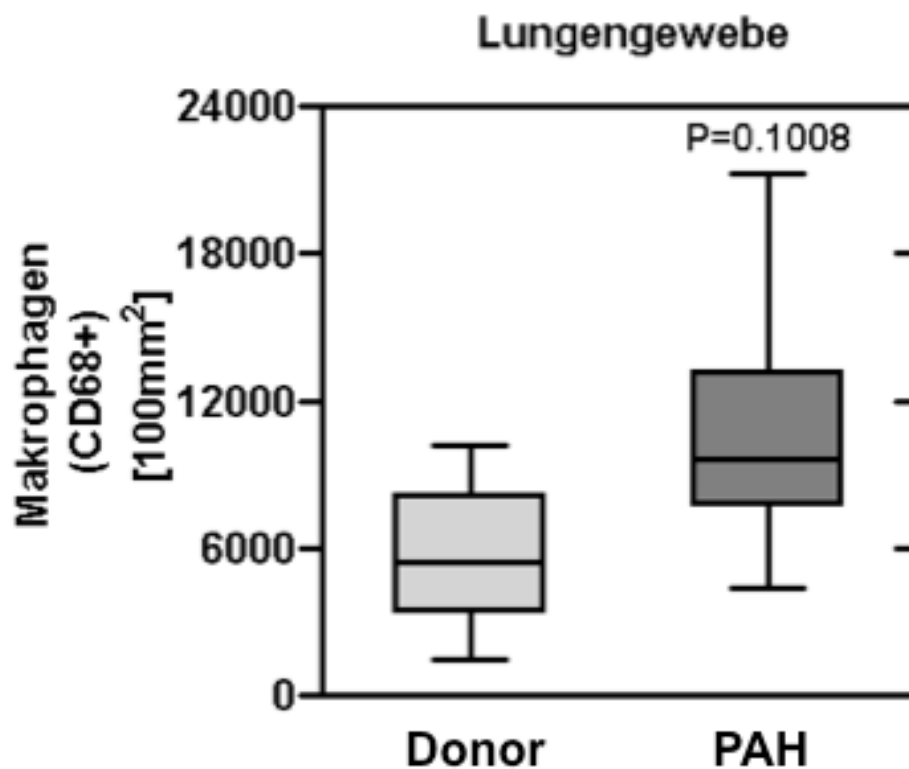


Abb. 14: Makrophagenanzahl im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); p=0,1008

Ergebnisse

Wie in den Abbildungen 13 a und 13 b zu erkennen ist, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Summe der im gesamten Lungenschnitt vorkommenden CD 68-positiven Zellen im Vergleich zwischen gesundem und PAH Lungengewebe

(Donor = 5615 ± 851 Zellen; PAH = 10540 ± 1516 Zellen; $p = 0,1008$).

Pulmonale Gefäße

Die Auswertung der gefärbten Makrophagen im Bereich der pulmonalarteriellen Gefäße und in ihrer unmittelbaren Umgebung ergab jedoch deutliche Unterschiede. So konnten weitaus mehr angefärbte Zellen in diesen Bereichen bei PAH-Lungen (Abb. 15 b) gezählt werden als bei den Donor-Lungen (Abb. 15 a).

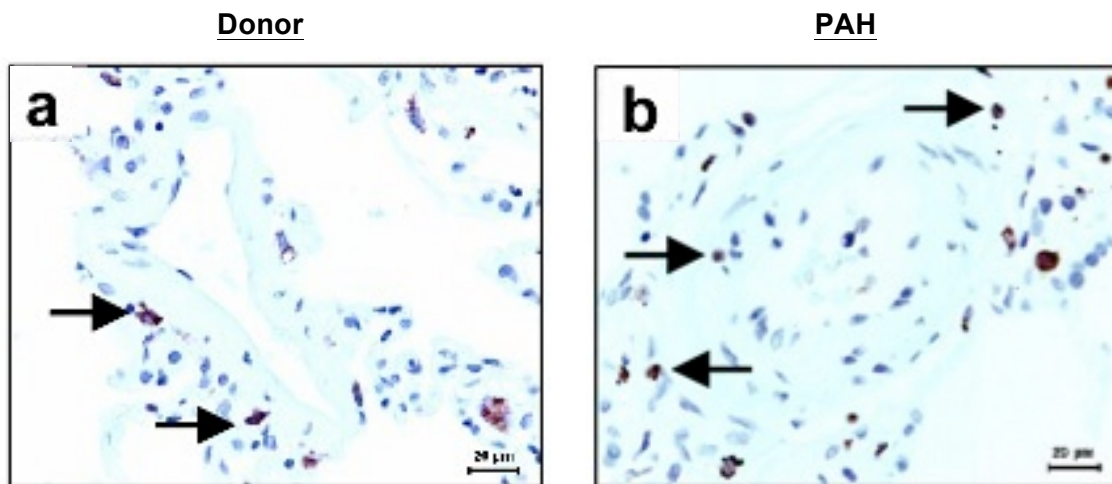


Abb. 15 a, b: CD 68-Färbung im Bereich pulmonalarterieller Gefäße bei einer Donor-Lunge (c) und bei einer PAH-Lunge (d). Scale bar = 20 µm

Ergebnisse

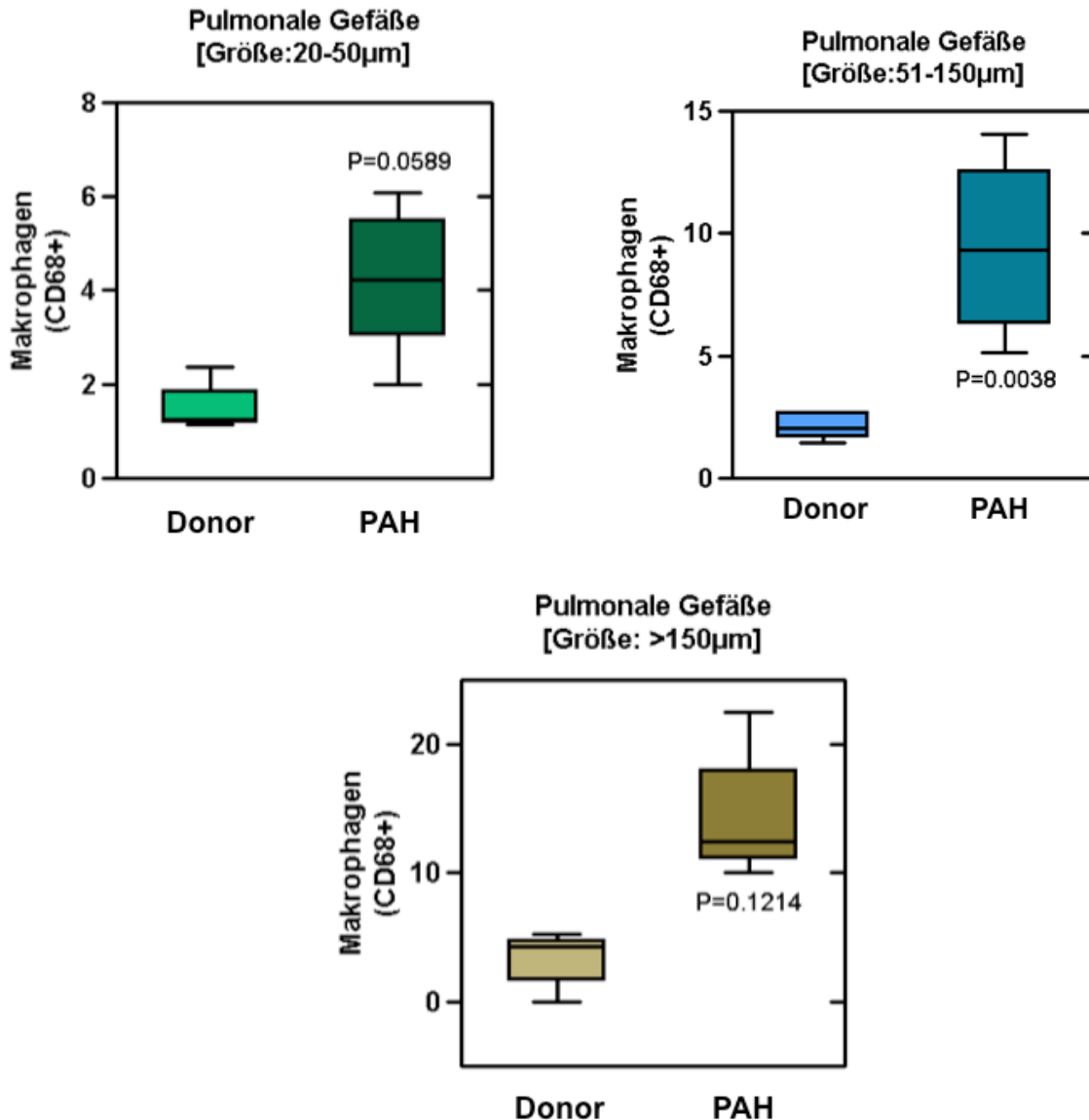


Abb. 16: Verteilung der Makrophagen im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 µm; 51-150 µm; >150 µm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

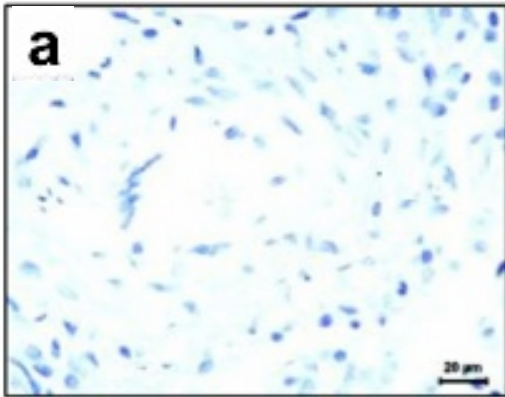
Die quantitative Analyse der Makrophagen im perivaskulären Bereich bezogen auf die unterschiedlichen Gefäßdurchmesser (20-50 µm, 50-150 µm und >150 µm) zeigte signifikante Unterschiede.

Im perivaskulären Gewebe um Gefäße mit einem Durchmesser von 51-150 µm herum konnten deutlich mehr Makrophagen bei PAH-Lungen gefunden werden, im Vergleich zu Donor-Lungen (Donor = $2,15 \pm 0,24$ Zellen; PAH = $9,42 \pm 1,52$ Zellen; $p = 0,0038$).

Kein signifikanter Unterschied zeigt sich beim Vergleich von Donor-Lungen mit PAH-Lungen im Gebiet um Gefäße mit einem Durchmesser von 20-50 µm (Donor = $1,47 \pm 0,23$ Zellen; PAH = $4,27 \pm 0,67$ Zellen; $p = 0,0589$) und einem Durchmesser von >150 µm (Donor = $3,44 \pm 0,91$ Zellen; PAH = $14,14 \pm 2,17$ Zellen ; $p = 0,1214$).

Kontrollfärbungen

Negativ



Positiv

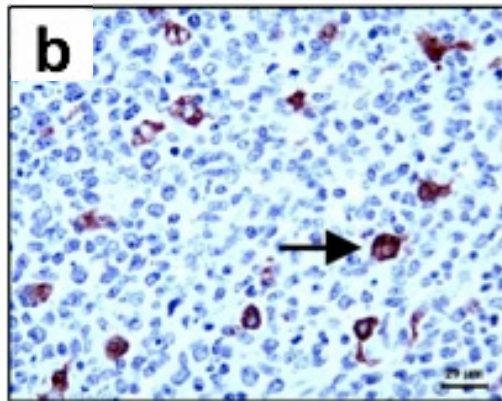


Abb. 17 a: Negativkontrolle der CD 68-Färbung, humanes Lungengewebe, Abb. 17 b: Positivkontrolle der CD 68-Färbung, humanes Tonsillengewebe. Scale bar = 20 μ m

Die Negativkontrollen für die CD 68Färbung wurden an Gewebe von humanen Lungen durchgeführt, die Positivkontrollen an humanem Tonsillengewebe (Abb. 17 a, b).

3.3.3 Anzahl und Lokalisierung von dendritischen Zellen

Um CD 209-positive, dendritische Zellen zu identifizieren, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD 209 (DC Sign) etabliert. Hierbei handelt es sich um einen C-Typ Lectin-Rezeptor.

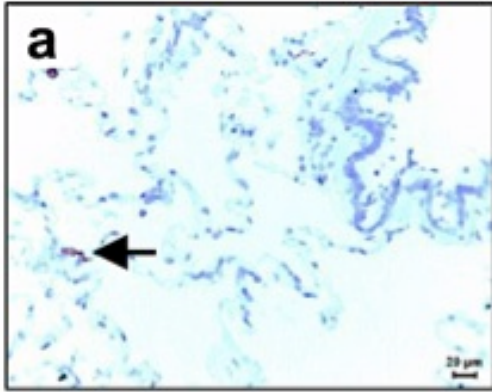
CD 209-positive Zellen wurden sowohl im Perivaskulärgewebe, als auch im Lungenparenchym gefunden.

Die Auszählung der Zellen ergab einen beeindruckenden Unterschied zwischen Donor-Lungen und PAH-Lungen bezüglich dem Vorkommen von CD 209-positiven Zellen (Abb. 18 a, b).

Ergebnisse

Lungengewebe

Donor



PAH

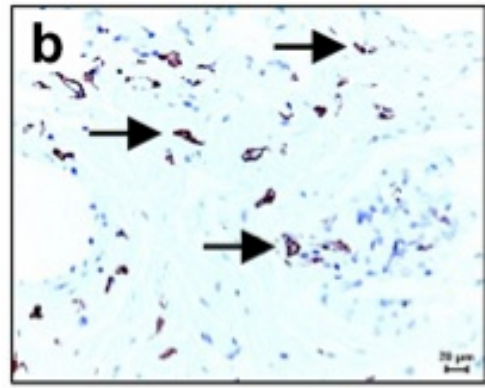


Abb. 18 a, b: CD 209-Färbung im peripheren Lungengewebe bei einer Donor-Lunge (a) und bei einer PAH-Lunge (b). Scale bar = 20 µm

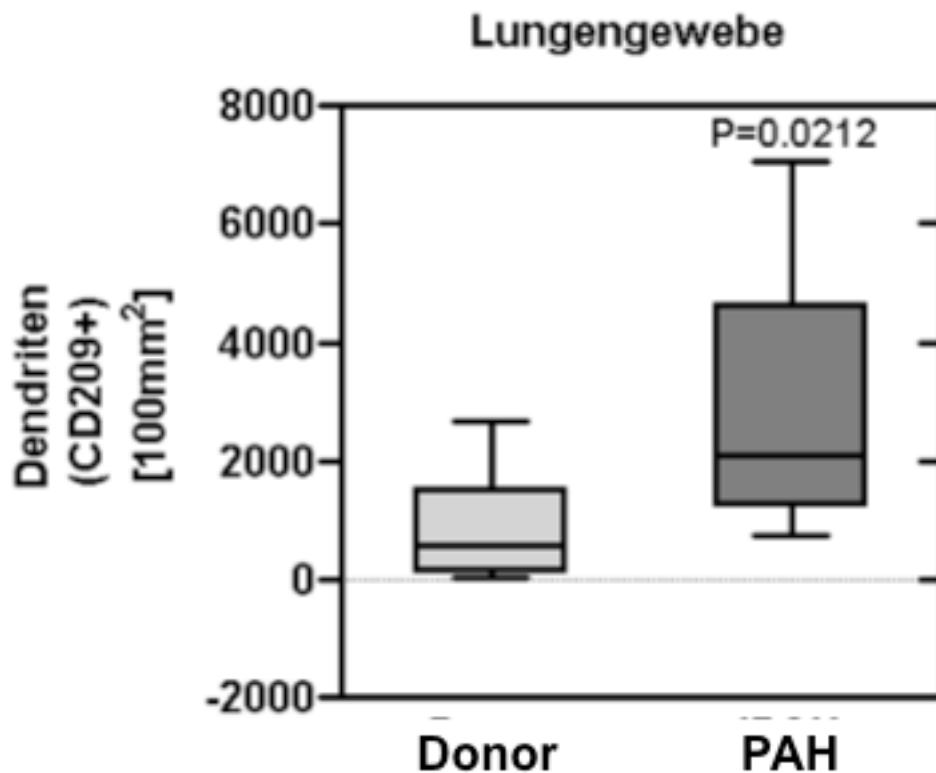


Abb. 19: Anzahl an dendritischen Zellen im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); p=0,0212

Bei der Auswertung der gesamten Lungenschnitte konnten im Gewebe von PAH-Lungen signifikant mehr CD 209 positive und somit dendritische Zellen gezählt werden (Abb. 14b) als

Ergebnisse

im Gewebe von gesunden Donor-Lungen (Abb. 14a) (Donor = 882 ± 286 Zellen ; PAH = 2760 ± 656 Zellen; $p = 0,0212$).

Pulmonale Gefäße

Bei einem Vergleich des perivaskulären Gewebes und der Auszählung der angefärbten Zellen im Bereich pulmonalarterieller Gefäße bei Donor-Lungen und PAH-Lungen konnten signifikant mehr dendritische Zellen in den PAH-Lungenschnitten gezählt werden (Abb. 20 a, b).

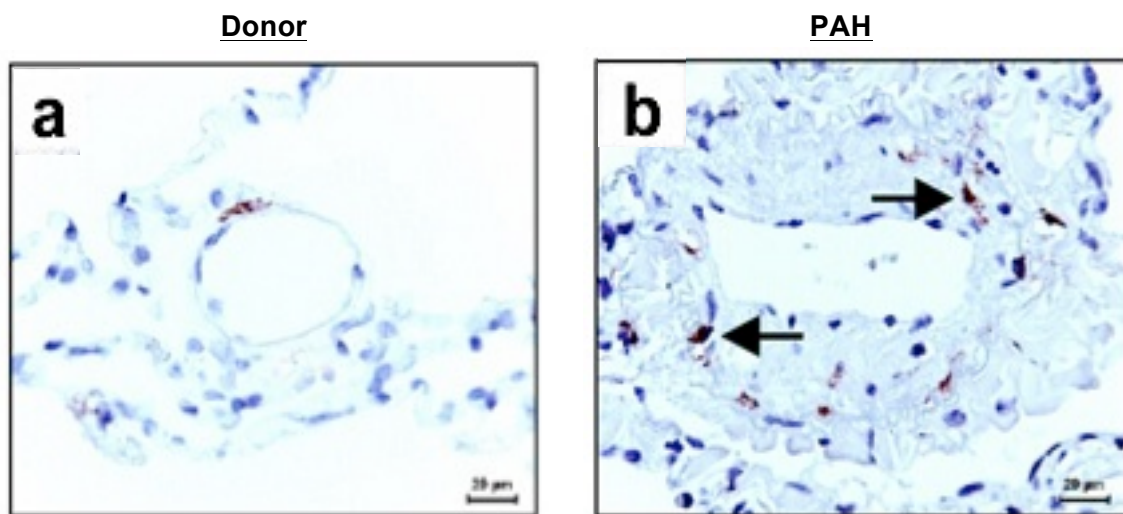


Abb. 20 a, b: CD 209-Färbung im Bereich pulmonalarterieller Gefäße bei einer Donor-Lunge (c) und bei einer PAH-Lunge (d). Scale bar = 20 µm

Ergebnisse

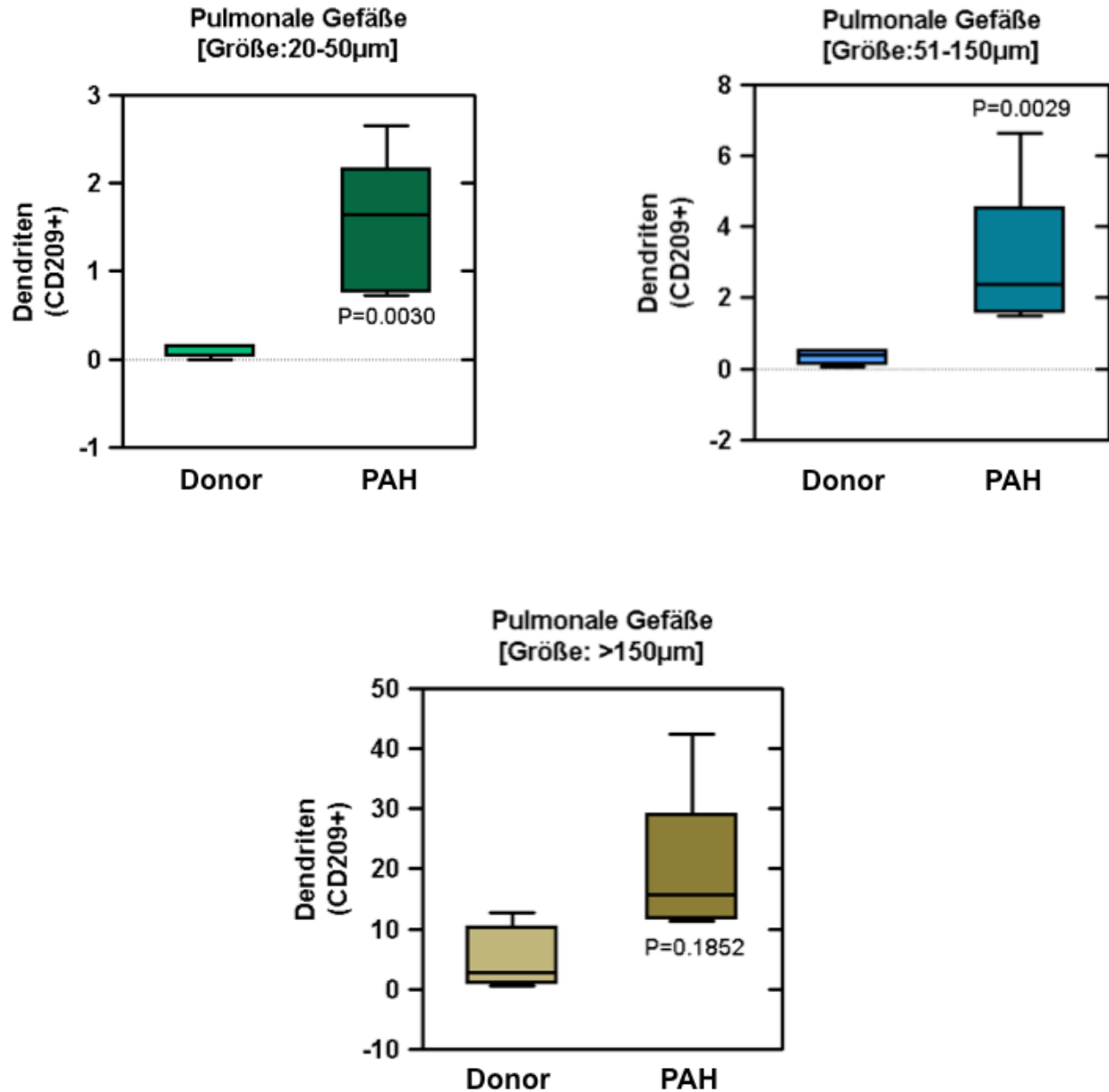


Abb. 21: Verteilung von dendritischen Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 µm; 51-150 µm; >150 µm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

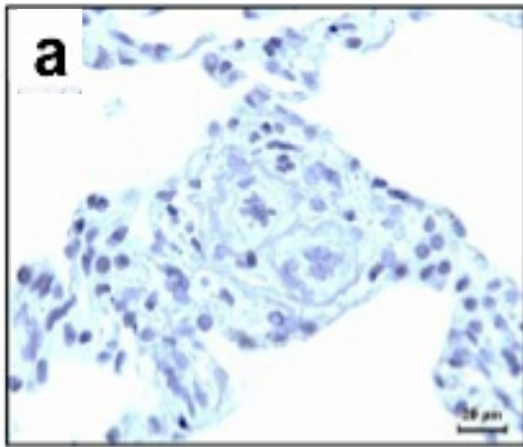
Wie Abbildung 21 zeigt, war das Vorkommen von dendritischen Zellen in PAH-Lungen im Bereich von Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 20-50 µm (Donor = $0,11 \pm 0,03$ Zellen; PAH = $1,49 \pm 0,35$ Zellen; $p = 0,0030$) und einem Durchmesser von 51-150 µm (Donor = $0,33 \pm 0,1$ Zellen; PAH = $2,93 \pm 0,95$ Zellen; $p = 0,029$) im Vergleich zu Donor-Lungen deutlich höher.

Bei den dendritischen Zellen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im quantitativen Vorkommen der Zellen beim Vergleich von PAH-Lungen mit Donor-Lungen im Bereich von Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von >150 µm gefunden werden. (Donor = $4,62 \pm 2,72$ Zellen; PAH = $19,40 \pm 5,81$ Zellen; $p = 0,1852$).

Ergebnisse

Kontrollfärbungen

Negativ



Positiv

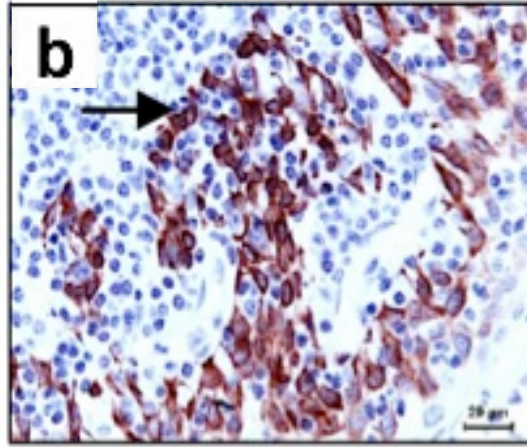


Abb. 22 a: Negativkontrolle der CD 209-Färbung, humanes Lungengewebe, Abb. 22 b: Positivkontrolle der CD 209-Färbung, humanes Tonsillengewebe. Scale bar = 20 µm

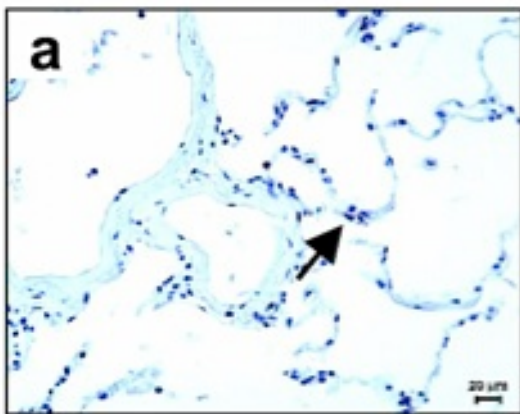
Die Negativkontrolle der CD 209-Färbung wurde an humanem Lungengewebe durchgeführt, für die Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte von humanen Tonsillen verwendet (Abb. 22 a, b).

3.3.4 Anzahl und Lokalisierung von T-Lymphozyten

Um T-Lymphozyten nachzuweisen, wurde zunächst eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das CD 3 Antigen etabliert. Es folgt die Analyse positiv gefärbter Zellen im gesamten Lungenschnitt.

Lungengewebe

Donor



PAH

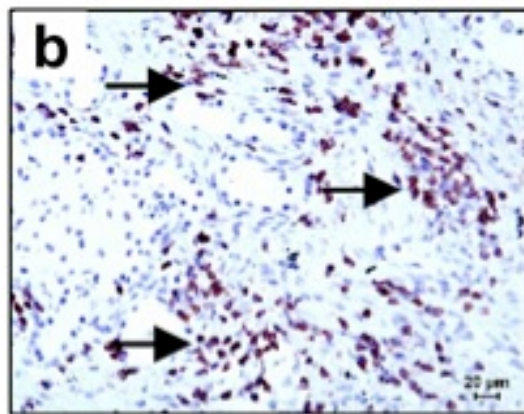


Abb. 23 a, b: CD3-Färbung im Lungenparenchym von Donor-Lungen (a) und im Parenchym von PAH-Lungen (b). Scale bar = 20 µm

CD3-positive Zellen waren sowohl im gesamten Lungenparenchym, wie auch im perivaskulären Lungengewebe gesunder Probanden kaum vorzufinden (Abb. 23 a). Bei der Betrachtung der PAH-Lungenschnitte konnten im Lungenparenchym ebenfalls nur wenige T-Lymphozyten gezählt werden (Abb. 23 b).

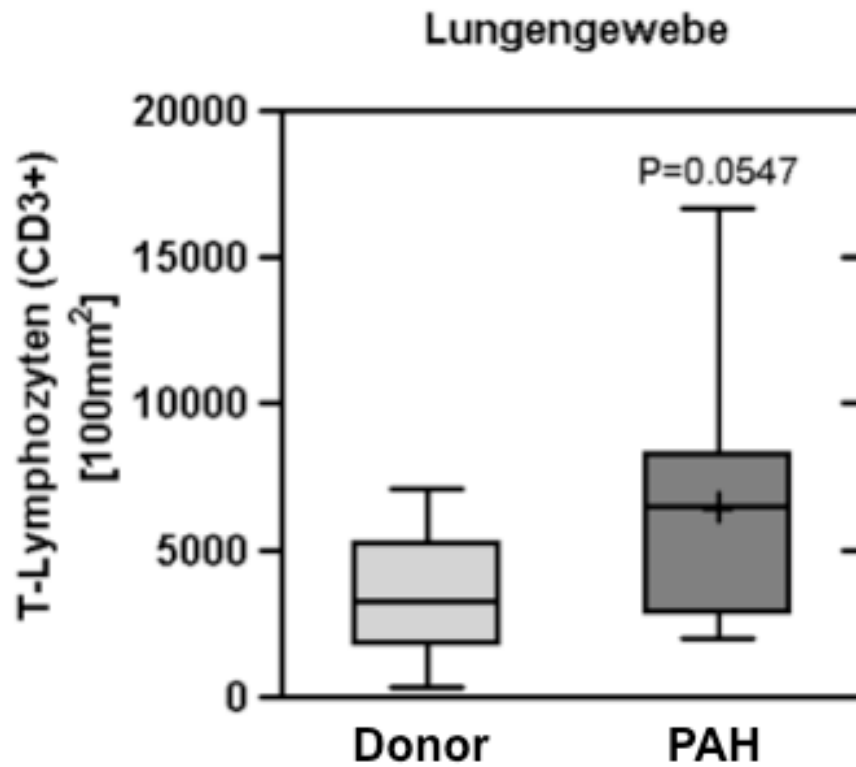


Abb. 24: Anzahl an T-Lymphozyten im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); p=0,0547

Wie Abbildung 24 veranschaulicht, sind T-Lymphozyten im Lungenparenchym lungengesunder Probanden kaum vorzufinden (Donor = 3470 ± 704 Zellen; PAH = 6464 ± 1394 Zellen; $p = 0,0547$).

Ergebnisse

Pulmonale Gefäße

Im Bereich pulmonalararterieller Gefäße konnten bei den Schnitten der PAH-Lungen deutlich mehr angefärbte Zellen gezählt werden als im Lungenparenchym.

Auch der Vergleich des Perivaskulärgewebes von Donor-Lungen (Abb. 25 a) und PAH-Lungen (Abb. 25 b) ergab bei den PAH-Schnitten eine weitaus größere Anzahl CD 3-positiver Zellen.

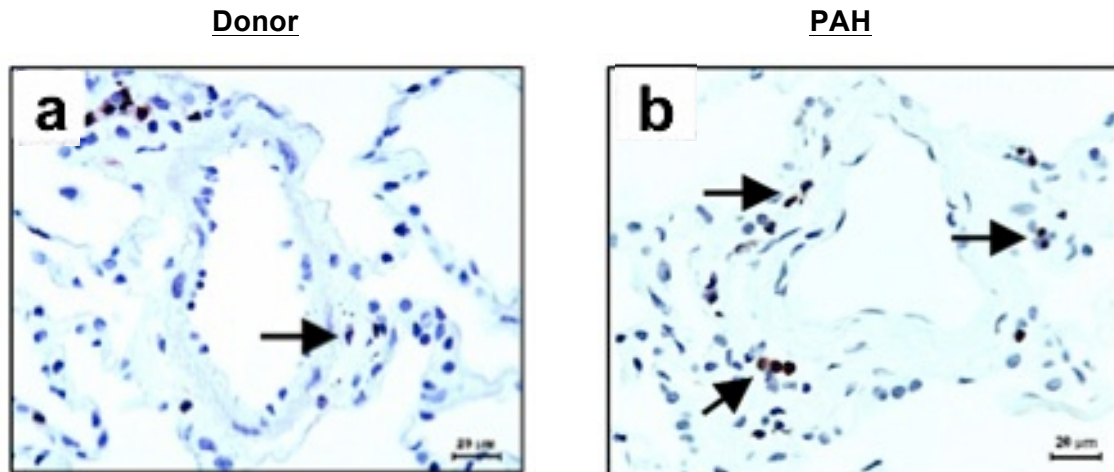


Abb. 25 a, b: CD 3-Färbung im perivaskulären Gewebe bei einer Donor-Lunge (c) und einer PAH-Lunge (d). Scale bar = 20 µm

Ergebnisse

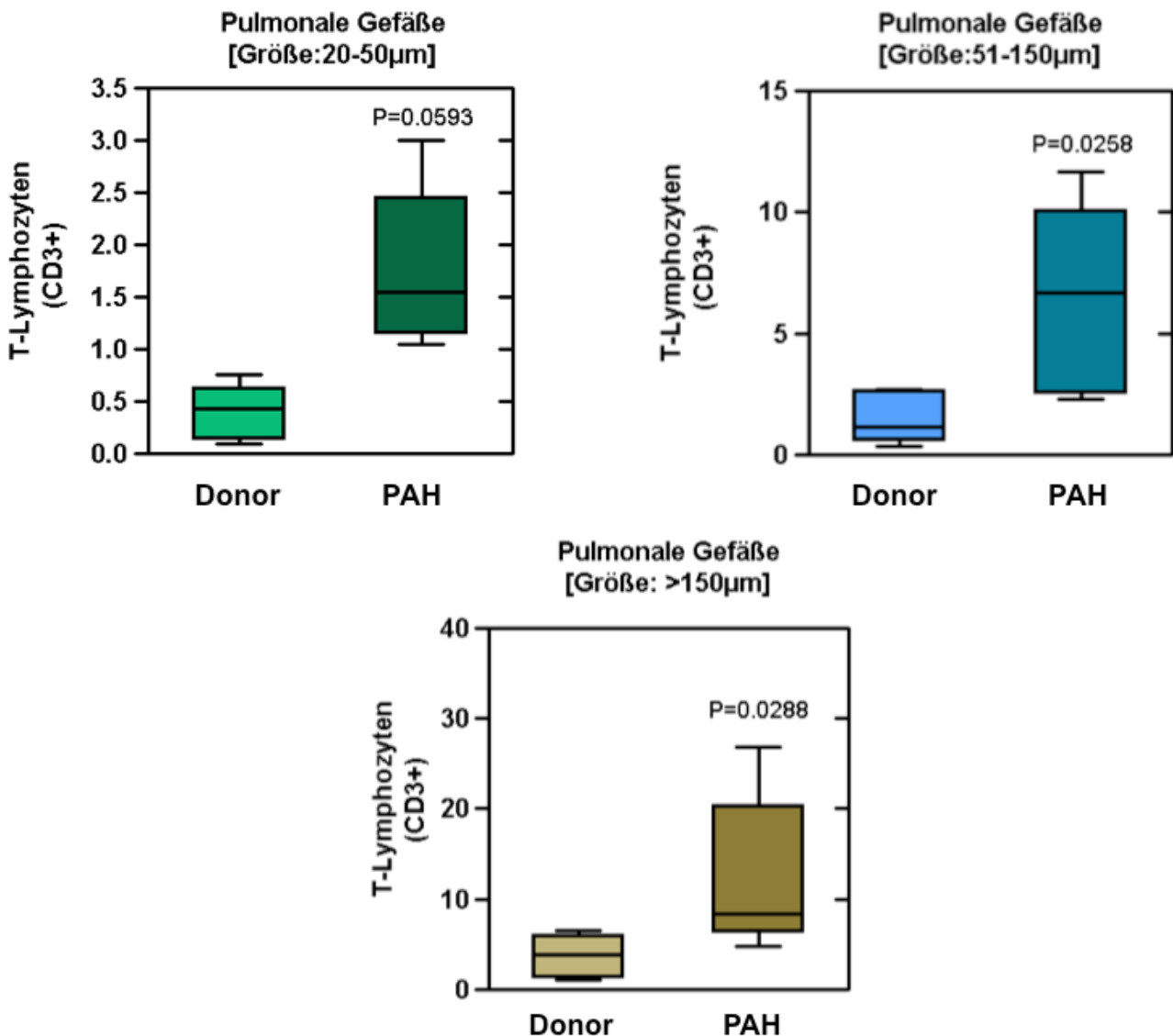


Abb. 26: Verteilung von T-Lymphozyten im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 µm; 51-150 µm; >150 µm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zellzählungen im peripheren Lungengewebe gesunder Probanden konnten CD 3-positive T-Lymphozyten in den PAH-Lungenschnitten im Bereich von pulmonalen Gefäßen aller Größenkategorien nachgewiesen werden. Im Vergleich hierzu wurden im Lungenparenchym der PAH-Lungen jedoch nur wenige T-Zellen nachgewiesen.

Die Anzahl der T-Lymphozyten war besonders im Perivaskulärbereich von PAH-Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 51-150 µm (Donor = $1,52 \pm 0,47$ Zellen; PAH = $6,37 \pm 1,77$ Zellen; $p = 0,0258$) und mit einem Durchmesser > 150 µm erhöht (Donor = $3,65 \pm 1,08$ Zellen; PAH = $12,33 \pm 3,89$ Zellen; $p = 0,0288$).

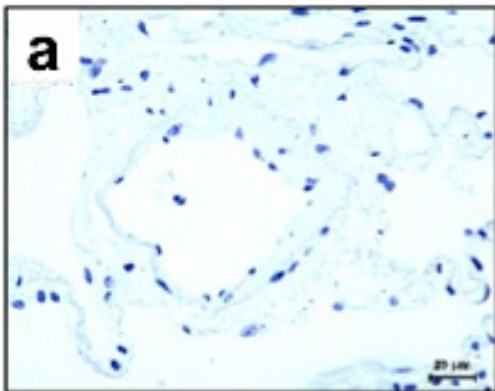
Kein signifikanter Anstieg von T- Lymphozyten war im Bereich von Pulmonalarterien mit

Ergebnisse

einem Durchmesser von 20-50 μm im Vergleich zwischen Donor-Lungengewebe und PAH-Lungen zu detektieren (Donor = $0,39 \pm 0,11$ Zellen; PAH = $1,75 \pm 0,34$ Zellen; $p = 0,0593$).

Kontrollfärbungen

Negativ



Positiv

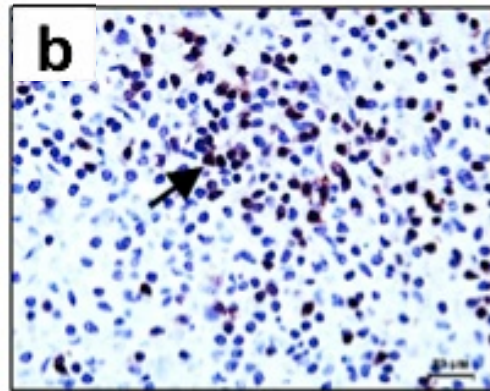


Abb. 27 a: Negativkontrolle der CD 3-Färbung, humanes Lungengewebe, Abb. 27 b: Positivkontrolle der CD 3-Färbung, humanes Milzgewebe. Scale bar = 20 μm

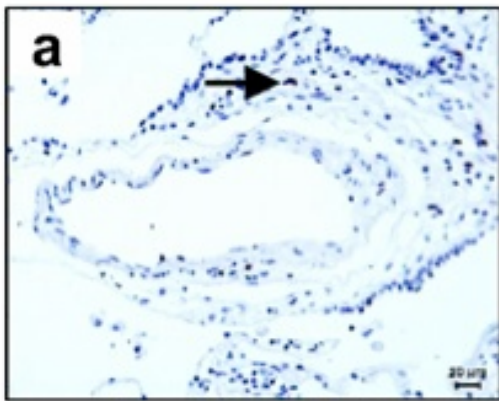
Die Negativkontrollen für die CD3-Färbung wurden an humanem Lungengewebe durchgeführt. Für die Positivkontrollen wurde Milzgewebe verwendet (Abb. 27 a, b), da hier im Bereich der periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) ein reichliches Vorkommen von T-Lymphozyten zu verzeichnen ist.

3.3.5 Anzahl und Lokalisierung von zytotoxischen T-Zellen

Um zusätzlich eine quantitative Analyse der zytotoxischen T-Zellen durchführen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das CD 8 Antigen etabliert. Beim Auszählen der gesamten Lungenschnitte konnte ein deutlich vermehrtes Vorkommen von zytotoxischen T-Zellen in PAH-Lungen im Vergleich zu Donor-Lungen nachgewiesen werden (Abb. 28 a, b).

Lungengewebe

Donor



PAH

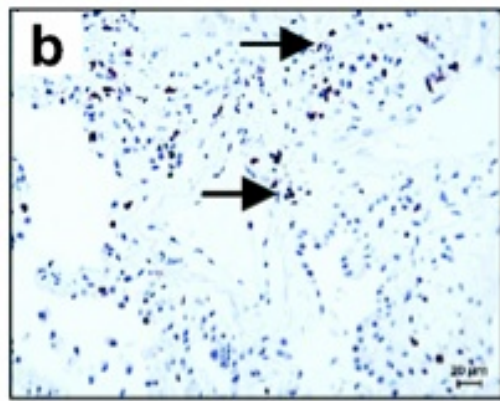


Abb. 28 a, b: CD 8-Färbung im Lungenparenchym einer Donor-Lunge (a) und einer PAH-Lunge (b). Scale bar = 20 μm

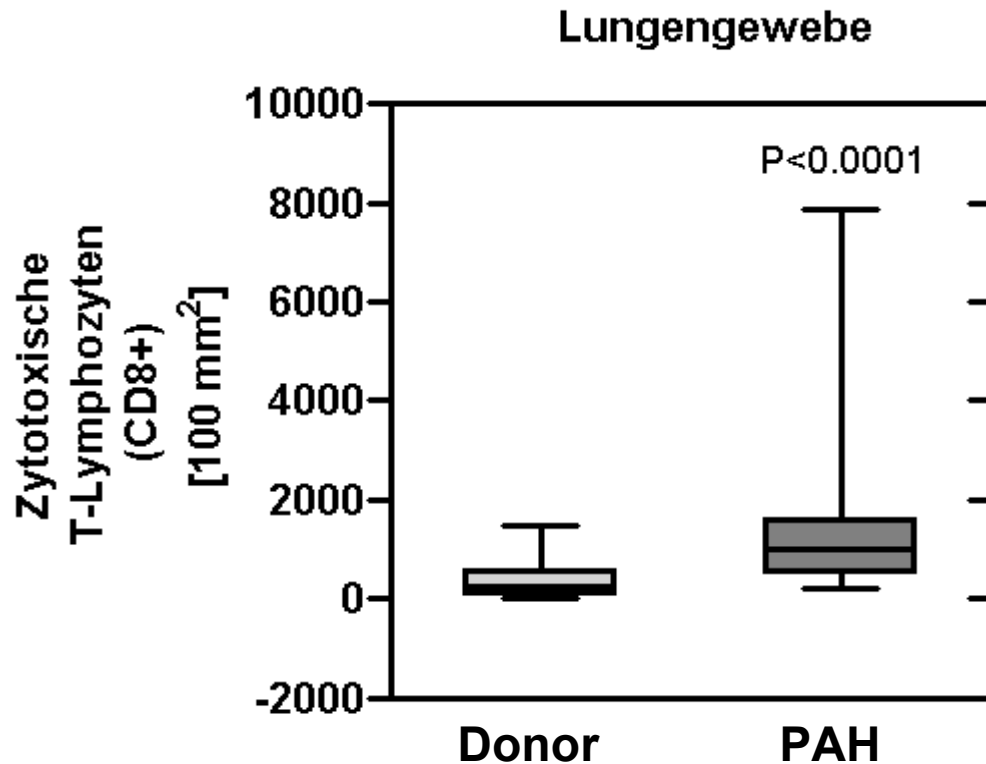


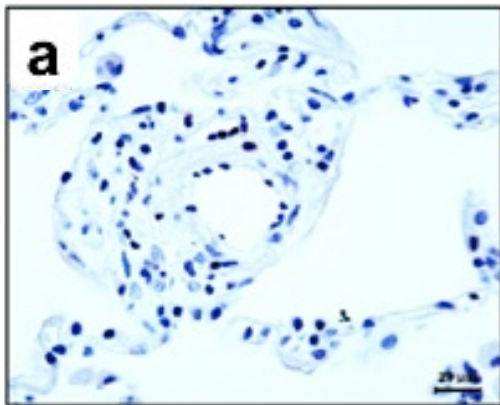
Abb. 29: Anzahl zytotoxischer T-Zellen im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); $p < 0,0001$

Die quantitative Analyse CD8-positiver Zellen im gesamten Lungenschnitt ergab eine deutlich erhöhte Zellzahl in den Schnitten von PAH-Lungen als in Lungenschnitten gesunder Probanden, wie in Abbildung 29 dargestellt (Donor = 385 ± 139 Zellen; PAH = 1662 ± 706 Zellen; $p < 0,0001$).

Pulmonale Gefäße

Die CD 8-positiven, zytotoxischen T-Zellen kamen auch im Bereich der pulmonalen Gefäße bei den PAH-Lungenschnitten gehäuft vor im Vergleich zum Perivaskulärgewebe der Donor-Lungenschnitte (Abb. 30 a, b).

Donor



PAH

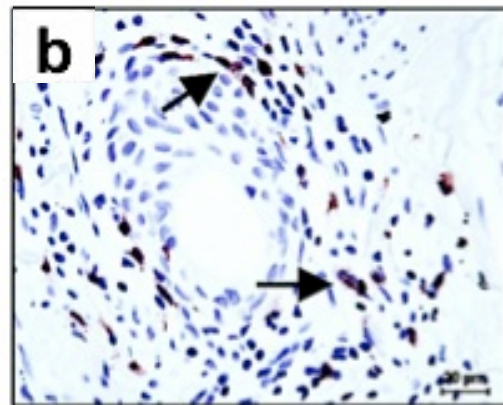


Abb. 30 a, b: CD 8-Färbung im Perivaskulärbereich einer Donor-Lunge (c) und im Perivaskulärbereich einer PAH-Lunge (d). Scale bar = 20 µm

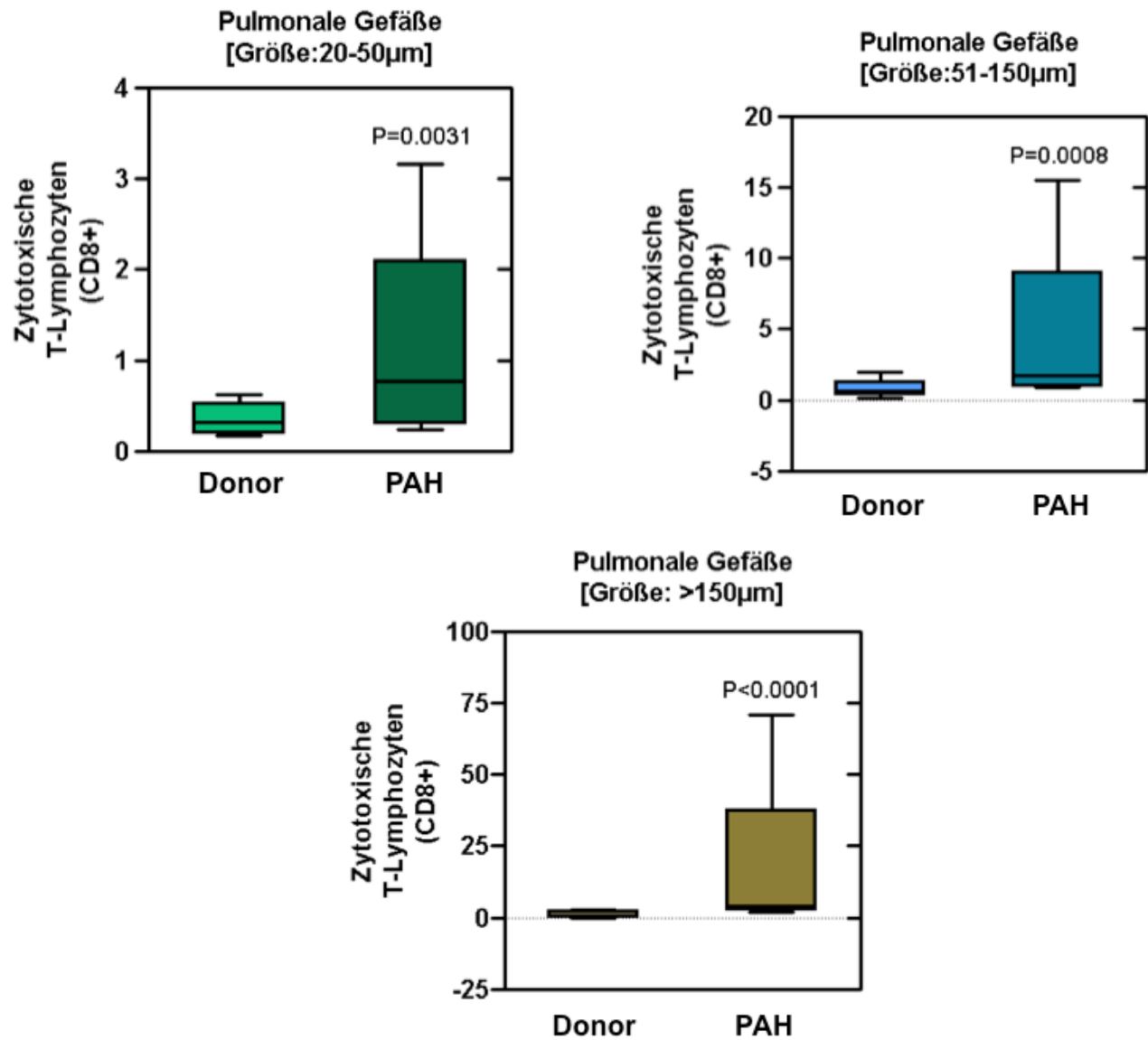


Abb. 31: Verteilung von zytotoxischen T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 μm; 51-150 μm; >150 μm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

Das Vorkommen von CD 8 positiven, zytotoxischen T-Zellen war im Bereich von pulmonalen Gefäßen aller Größenkategorien (20-50 μm; 51-150 μm; >150 μm) bei PAH-Lungen deutlich erhöht im Vergleich mit den Donor-Lungen

(20-50 μm: Donor = $0,35 \pm 0,08$ Zellen; PAH = $1,11 \pm 0,53$ Zellen; $p = 0,0031$;

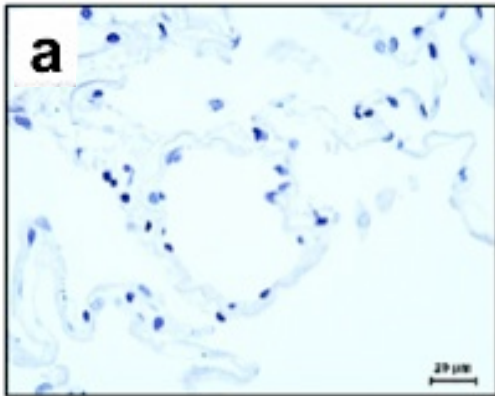
51-150 μm: Donor = $0,79 \pm 0,31$ Zellen; PAH = $4,37 \pm 2,80$ Zellen; $p = 0,0008$;

> 150 μm: Donor = $1,17 \pm 0,53$ Zellen; PAH = $16,98 \pm 13,51$ Zellen; $p = 0,0001$).

Ergebnisse

Kontrollfärbungen

Negativ



Positiv

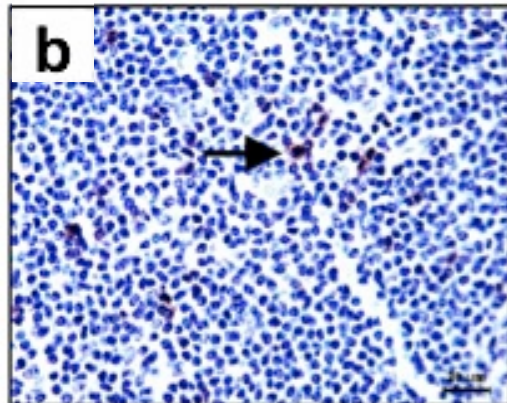


Abb. 32 a: Negativkontrolle der CD 8-Färbung, humanes Lungengewebe, Abb. 32 b: Positivkontrolle der CD 8-Färbung, humanes Tonsillengewebe. Scale bar = 20 µm

Für die Negativkontrollen der CD 8-Färbung wurde humanes Lungengewebe verwendet. Die Positivkontrollen wurden an humanem Tonsillengewebe durchgeführt (Abb. 32 a, b).

3.3.6 Anzahl und Lokalisierung von regulatorischen T-Zellen

Der qualitative und quantitative Nachweis von regulatorischen T-Zellen wurde durch die Etablierung einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen FOXP3 erbracht. Zunächst erfolgte die Auswertung der gesamten Lungenschnitte und somit des gesamten Lungenparenchyms.

Ergebnisse

Lungengewebe

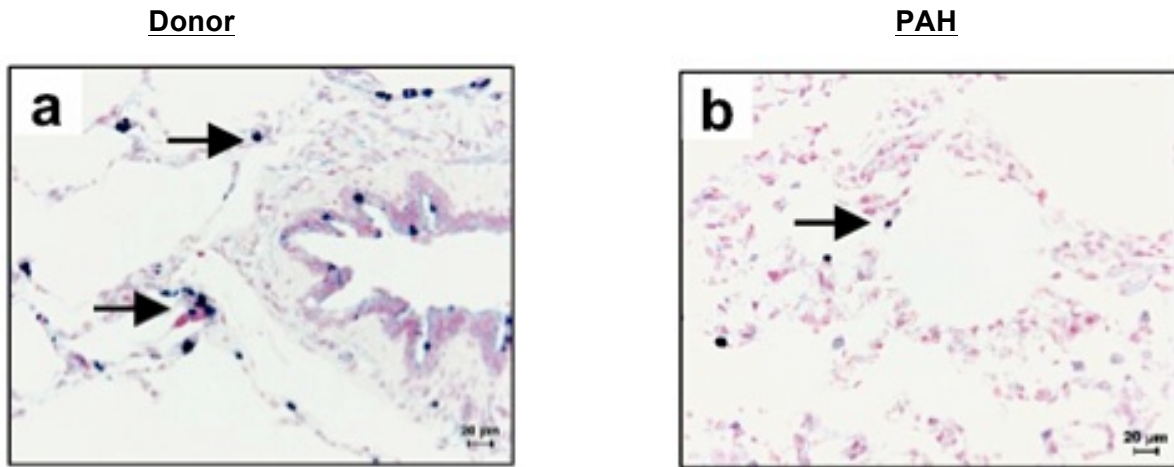


Abb. 33 a, b: FOXP3-Färbung im Lungenparenchym gesunder Probanden (a) und im Parenchym an PAH erkrankter Patienten (b). Scale bar = 20 µm

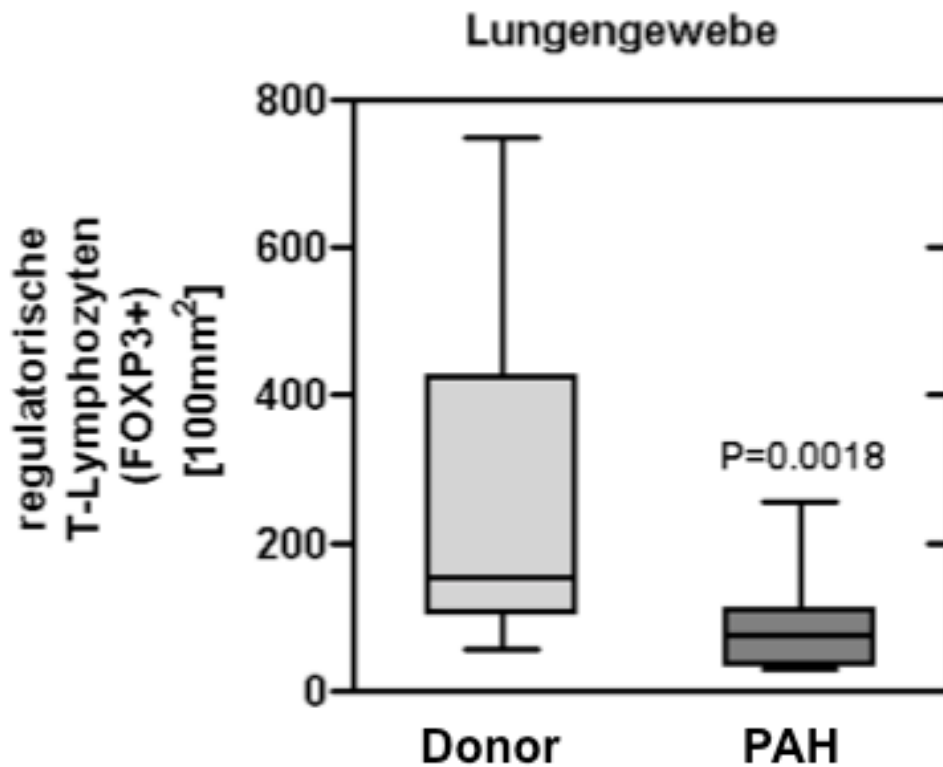


Abb. 34: Anzahl an regulatorischen T-Zellen im gesamten Lungenschnitt bei Donor-Lungen (n=10) und PAH-Lungen (n=10); $p < 0,0018$

Die Analyse zeigt ein moderates Vorkommen von FOXP3-positiven Zellen in den Lungenschnitten pulmonal gesunder Probanden (317 ± 61 Zellen/100mm²), (Abb. 34).

In PAH-Lungenschnitten konnte ein deutlich verringertes Vorkommen FOXP3-positiver Zellen nachgewiesen werden ($87,2 \pm 21,4$ Zellen/100mm²; $p = 0,0044$).

Pulmonale Gefäße

Bei der quantitativen Analyse der FOXP3-positiven Zellen im Bereich der pulmonalarteriellen Gefäße ergab sich innerhalb der Adventitia, der durch das pulmonalarterielle Remodelling veränderten PAH Gefäße, ein deutlich geringeres Vorkommen von regulatorischen T-Zellen (Abb. 35 b) als in der Donor-Gruppe (Abb. 35 a).

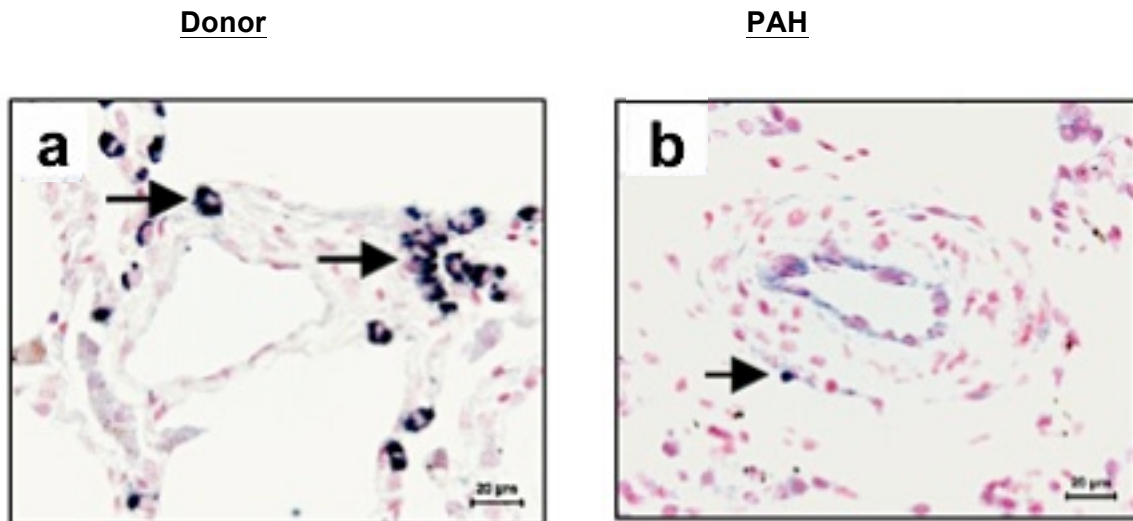


Abb. 35 a, b: FOXP3-Färbung im Bereich pulmonalarterieller Gefäße bei Donor-Lungen (c) und bei PAH-Lungen (d). Scale bar = 20 µm

Ergebnisse

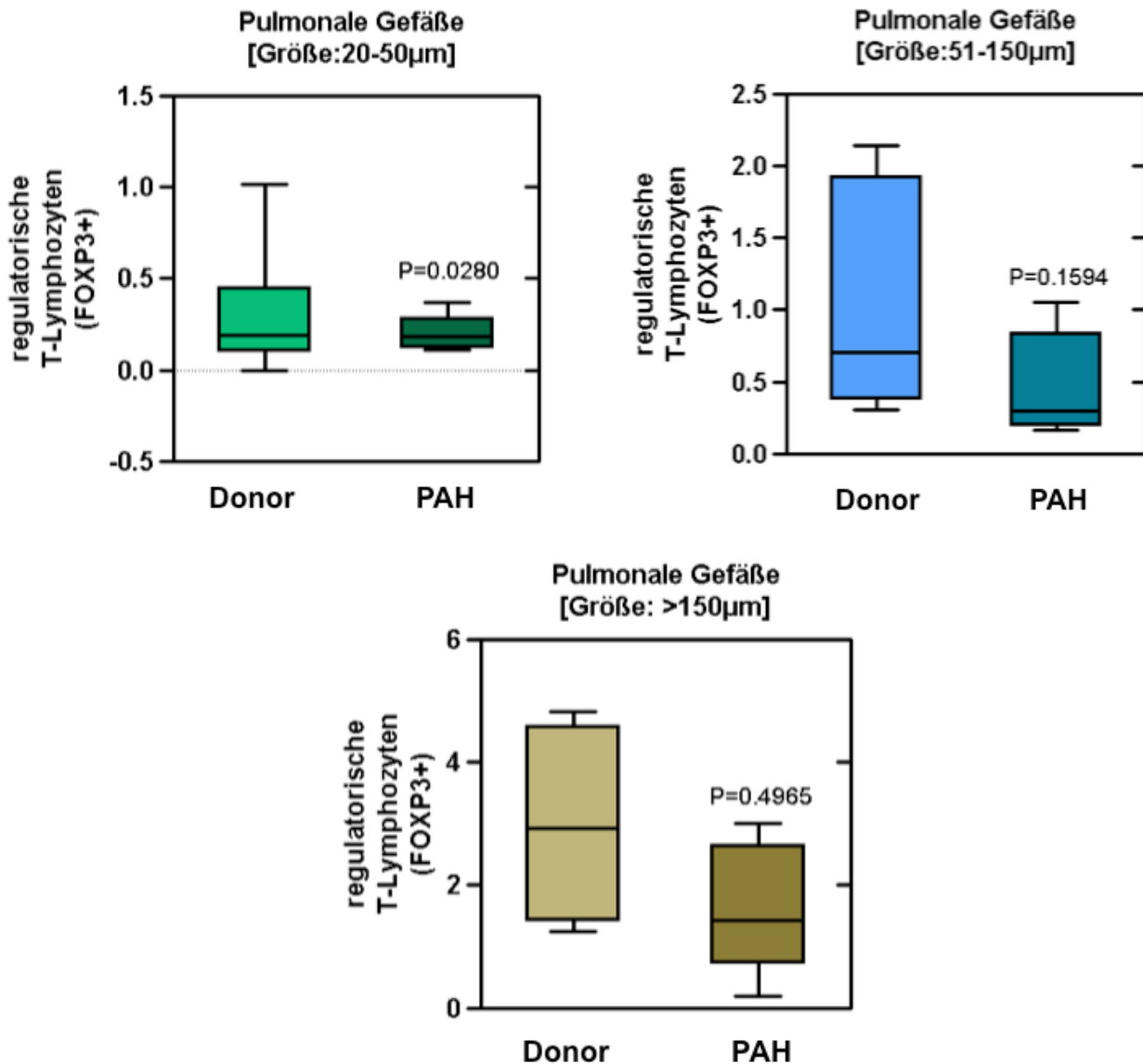


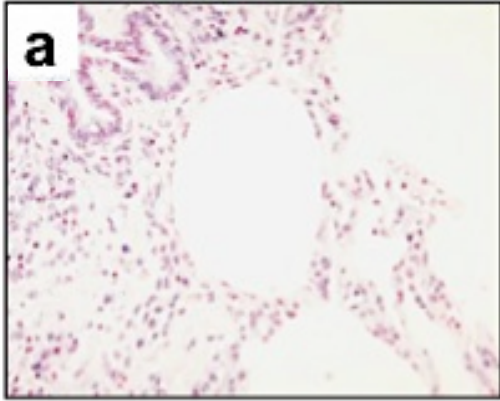
Abb. 36: Verteilung von regulatorischen T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größen (20-50 µm; 51-150 µm; >150 µm) bei Donor-Lungen (n=10) und bei PAH-Lungen (n=10)

Die Auswertung des Vorkommens von regulatorischen T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße von mittlerem und kleinem Durchmesser detektierte für Lungenschnitte der PAH-Gruppe ein deutlich geringeres Vorkommen jener Zellen als bei der Donor-Gruppe (Abb. 36), (20-50 µm: PAH = $0,18 \pm 0,27$ Zellen; Donor = $0,60 \pm 0,15$ Zellen; $p = 0,0055$; 51-150 µm: PAH = $0,60 \pm 0,13$ Zellen; Donor = $1,94 \pm 0,39$ Zellen; $p = 0,0368$). Im Bereich der großen pulmonalen Gefäße fanden sich keine wesentlichen Änderungen des quantitativen Vorkommens der FOXP3-Zellen (> 150 µm: PAH = $1,44 \pm 0,45$ Zellen; Donor = $2,99 \pm 0,63$ Zellen; $p = 0,4253$).

Ergebnisse

Kontrollfärbungen

Negativ



Positiv

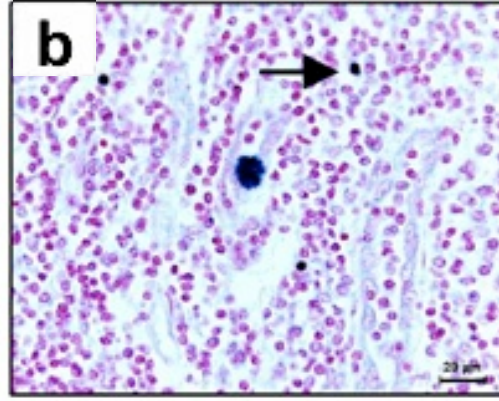


Abb. 37 a: Negativkontrolle der FOXP3-Färbung, humanes Lungengewebe, Abb. 37 b: Positivkontrolle der FOXP3-Färbung, humanes Tonsillengewebe. Scale bar = 20 µm

Die Negativkontrollen der FOXP3-Färbung wurden an humanem Lungengewebe durchgeführt. Für die Positivkontrollen wurde Gewebe von humanen Tonsillen verwendet (Abb. 37 a, b).

Zusammenfassend kann anhand der erlangten Ergebnisse die Aussage getroffen werden, dass in humanem PAH-Lungengewebe ein signifikant vermehrtes Vorkommen von Immunzellen und inflammatorischen Zellen im Vergleich zu gesunden Donoren zu verzeichnen ist. Sowohl im peripheren Lungengewebe, als auch im Perivaskulärbereich und in den Wandschichten der pulmonalarteriellen Gefäße bei PAH-Lungen konnten im Vergleich zu Donor-Lungen deutlich mehr angefärbte Zellen gezählt werden.

4. Diskussion

Bei der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) handelt es sich um ein sehr schweres Krankheitsbild mit einem nicht selten letalen Verlauf.

Die Charakteristika der PAH sind geprägt durch Umbauprozesse in den Wandschichten pulmonalarterieller Gefäße, die als sogenanntes Remodelling bezeichnet werden. Durch diese pathologischen Veränderungen innerhalb der pulmonalarteriellen Gefäße kommt es zu einer dauerhaften Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks und als Folge zu einer vermehrten Rechtsherzbelastung, die im Verlauf zum Rechtsherzversagen führen kann (Rubin et al. 1997).

Obwohl es durch die medizinisch-wissenschaftliche Forschung einen steten Fortschritt im Bereich der Diagnostik und der Therapie der PAH gibt, so ist dennoch bisher noch keine Möglichkeit der Heilung dieser Erkrankung in Sicht.

Für eine optimale und gezielte Therapie dieses Krankheitsbildes ist eine vorausgehende gründliche Diagnostik notwendig, die Informationen über die Ursache, den Schweregrad und die akute Reversibilität der Erkrankung liefern kann.

Noch immer gibt es für einige Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie keine zugelassene Therapie. Die derzeitigen Therapieoptionen der PAH zielen vor allem auf eine Linderung der Symptome und eine Besserung der Hämodynamik ab.

Leider unterscheiden sich international die Kriterien zur Indikation verschiedener, zur Therapie der PAH angewendeter Medikamente, noch deutlich. Und auch die Zulassung der Medikamente ist uneinheitlich geregelt.

In Bezug auf die Diagnostik und die Therapie der PAH gilt es in den nächsten Jahren noch viele Fragen zu klären. Es muß eine frühzeitige Diagnose dieser Erkrankung etabliert werden, von der die Patienten profitieren könnten. Um die Diagnose der PAH und ihre Therapie zu optimieren, ist es unabdingbar die pathophysiologischen Prozesse bei der Entstehung dieses Krankheitsbildes genau zu verstehen. Außerdem müssen die inflammatorische und immunologische Komponente der PAH weiter untersucht werden.

Inflammatorische Prozesse sind vorherrschend bei verschiedenen Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie und konnten als eine bedeutende pathogenetische Komponente des pulmonalen Gefäßremodellings bei PAH sowie bei Formen der PAH, die mit anderen systemischen inflammatorischen Syndromen oder einer viralen Ätiologie (beispielsweise HIV) assoziiert sind, eingestuft werden (Hassoun et al. 2009).

Die Hypothese der inflammatorischen Komponente konnte durch den Nachweis von perivaskulären Zellinfiltrationen mit Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten im Bereich plexiformer Läsionen im Lungengewebe von PAH-Patienten gestützt werden (Tuder et al. 1994, Perros et al. 2007, Savai et al. 2012). In Abbildung 26 ist schematisch die

Diskussion

Aktivierung von Immunzellen durch Chemokine und die folgende Initiierung des pulmonalarteriellen Remodellings dargestellt.

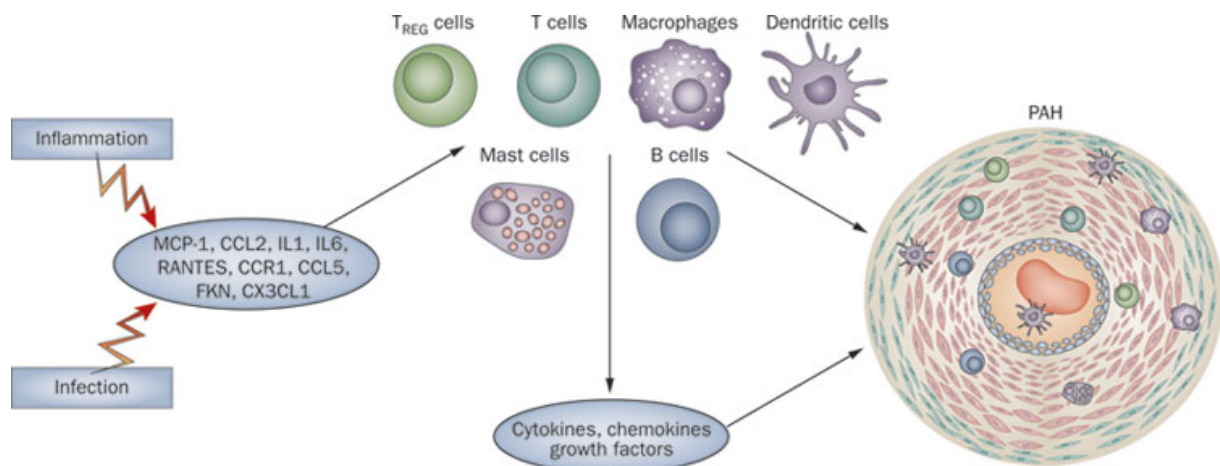


Abb. 38: Schematische Darstellung der Aktivierung von Immunzellen durch Chemokine bzw. Zytokine und die darauf folgende Initiierung des pulmonalarteriellen Remodellings; Schermuly et al., 2011

Als Reaktion auf eine Infektion oder ein inflammatorisches Ereignis kommt es innerhalb der Gefäßzellen der Lunge zur Bildung von bestimmten Chemokinen bzw. Zytokinen wie beispielsweise IL-1, IL-6, RANTES oder MCP-1. Diese wiederum bewirken eine Ansammlung von Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen (Schermuly et al. 2011). Durch das Zusammenspiel von Immunzellen und Chemokinen bzw. Zytokinen erfolgt die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und weiteren inflammatorischen Mediatoren. All diese Prozesse initiieren den Beginn des pulmonalarteriellen Remodellings (Hassoun et al. 2009, Pullamsetti et al. 2011), (Abb. 26). Dieses schließt die Proliferation von Gefäßzellen, die Migration von Immunzellen, die Bildung von *in situ Thrombosen* und die vermehrte Kollagenbildung ein.

In der vorliegenden Studie wurde humanes Lungengewebe gesunder Probanden im Vergleich zu Lungengewebe von an PAH erkrankten Probanden im Hinblick auf die Frage nach einer immunologischen oder inflammatorischen Komponente bei der Entstehung oder Progredienz der pulmonalarteriellen Hypertonie untersucht. Durch spezifische immunhistochemische Färbungen konnten verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und T-Lymphozyten im Bereich pulmonalarterieller Gefäße von PAH-Lungengewebe lokalisiert werden. Eine quantitative Analyse von Immunzellen und inflammatorischen Zellen erfolgte zum einen durch die Auswertung gesamter Lungengewebsschnitte und zum anderen durch die Auswertung des unmittelbaren

Diskussion

Perivaskulärbereiches, nachdem die pulmonalarteriellen Gefäße auf Grund ihres Durchmessers in verschiedene Größenkategorien eingeteilt wurden (20-50 μm , 51-150 μm , >150 μm). Jegliche Evaluationen erfolgten immer im direkten Vergleich von PAH-Lungengewebe und gesundem Lungengewebe.

Bei der Auszählung immunhistochemisch angefärbter dendritischer Zellen, Makrophagen und Monozyten in PAH-Lungengewebschnitten und in durch histologische Umbauprozesse veränderten pulmonalen Gefäßen dieser Lungenschnitte, wurde in dieser Studie eine deutliche Akkumulation genannter Zellpopulationen im Bereich vaskulärer Läsionen bei PAH vorgefunden und somit kann angenommen werden, dass diese Zelltypen beteiligt sind an der Immunopathologie der PAH.

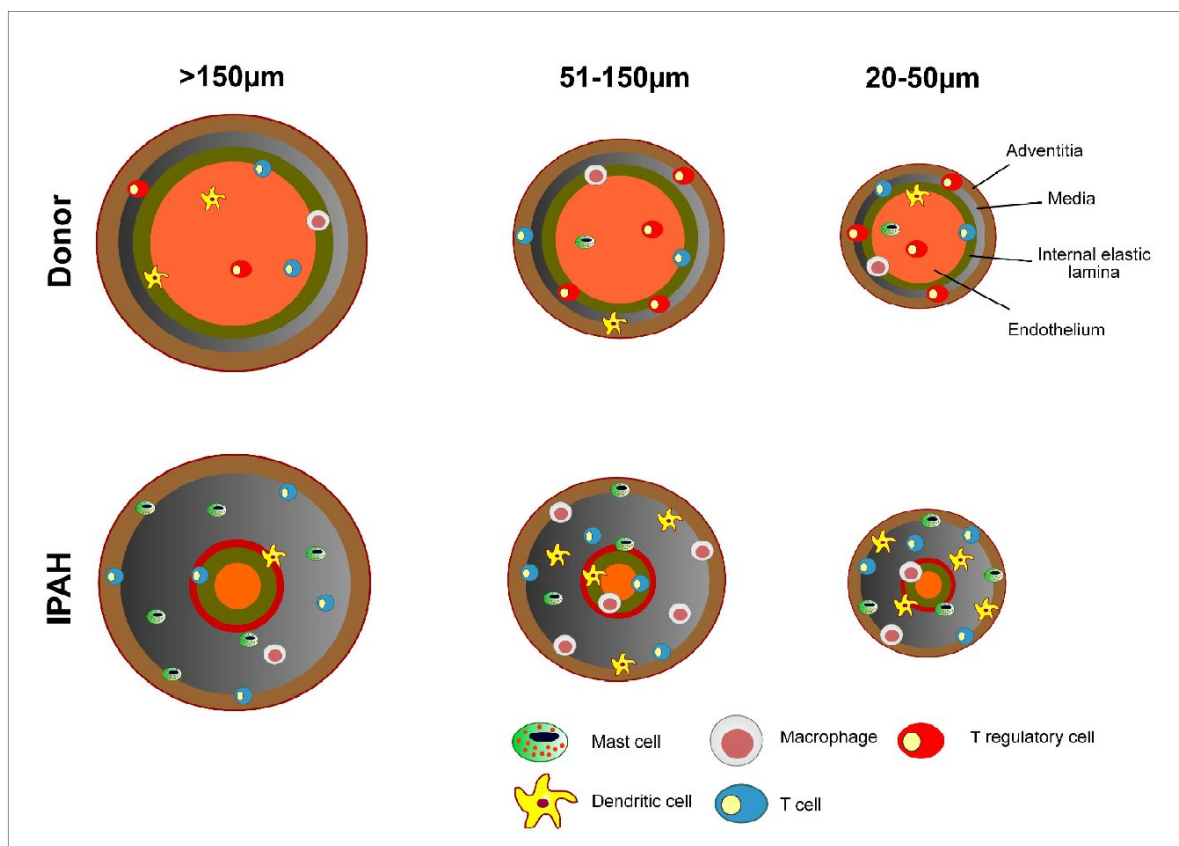


Abb. 39: Schematische Darstellung des pulmonalarteriellen Remodelings und der Beteiligung von Immun- und inflammatorischen Zellen an diesem Prozess

Passend zu dieser Annahme konnten Perros et al. (Perros et al. 2007) zeigen, dass im Bereich vaskulärer Läsionen bei PAH-Patienten und bei experimentell erzeugter pulmonaler Hypertonie eine Infiltration unreifer dendritischer Zellen vorlag. Eine Ansammlung dieser professionell antigenpräsentierenden Zellen könnte ein Zeichen für die Präsentation von

Diskussion

Antikörpern gegenüber Endothelzellen, Fibroblasten und nukleären Antigenen sein, die im Serum von PAH-Patienten und Patienten mit einer Kollagenose-assoziierten Form der PAH nachgewiesen werden können (Tamby et al. 2005, Tamby et al. 2006). Weiterhin könnte die Ansammlung der antigenpräsentierenden Zellen an der Rekrutierung und Stimulierung von T-Lymphozyten beteiligt sein (van Rijt et al. 2005).

Eine Ansammlung und Aktivierung von Makrophagen im Bereich der pathologisch veränderten pulmonalen Gefäße kann zu einer Freisetzung von Zytokinen und vasoaktiven Substanzen wie Endothelin, verschiedenen Eicosanoiden oder reaktiven Sauerstoff-Formen führen (Hall et al. 2009, Burke et al. 2009). Aktivierte Makrophagen geben außerdem Matrix Metalloproteinasen (MMP) ab, wie zum Beispiel MMP-9 und MMP-19, und uPA (urokinase like Plasminogen Activator). Diese Proteasen führen zum Abbau basaler Membranen und extrazellulärer Matrixkomponenten und scheinen bei der Migration von Leukozyten in Gewebeschichten behilflich zu sein. Des weiteren scheinen die Proteasen an einem proteolytischen Remodelling der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein und an der Beeinflussung der lokalen Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, die zur Unterstützung einer Aktivierung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen führen können (Stenmark et al. 2005, Frid et al. 2006). Schließlich könnten aktivierte Makrophagen eine wichtige Rolle spielen für die Antigenpräsentation bei T-Zellen (Wilson et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung vaskulärer Veränderungen und deren Krankheitsbilder, wie die PAH, einnehmen. Somit stellen sie einen wichtigen, vielversprechenden Faktor für die Therapie vaskulärer Erkrankungen und der PAH dar (Wilson et al. 2009).

In der vorliegenden Studie wurden keine funktionellen Untersuchungen zur Aktivierung oder Polarisierung von Makrophagen durchgeführt. Man kann daher nicht sagen, ob die beobachtete Akkumulation der Makrophagen für eine Immun- oder eine Autoimmunantwort auf die fortschreitende Entzündungsreaktion steht. Oder ob die Makrophagen-Akkumulation bedingt ist durch eine Kombination dieser beiden Immunreaktionen, hervorgerufen durch Veränderungen im Mikromilieu des erkrankten Gewebes (Fairweather et al. 2009, Mantovani et al., Porta et al. 2009).

Eine neue Studie mit an Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie erkrankten Mäusen zeigt, dass Makrophagen als Reaktion auf die Hypoxie drei verschiedene, aktivierte Phenotypen bilden. Dies sind klassisch aktivierte Makrophagen (M1), alternativ aktivierte Makrophagen (M2) und anti-inflammatorische Makrophagen. Auch konnte neben einer Akkumulation von Makrophagen eine erhöhte Konzentration an Zytokinen wie IL-1 β , IL-17, IL-2 FGF β und MIP-1 α im Lungengewebe dieser Mäuse nachgewiesen werden (Vergadi et

al. 2011).

In der vorliegenden Studie konnte des weiteren ein deutlich vermehrtes Vorkommen von Mastzellen im gesamten Lungengewebe und im Bereich kleiner und mittelgroßer pulmonalarterieller Gefäße bei PAH-Patienten detektiert werden. Das Vorkommen von Mastzellen im Bereich pulmonaler Gefäße konnte schon vor längerem demonstriert werden. Jedoch konnte bisher die genaue Rolle dieser Zellen bei der Entstehung des Krankheitsbildes der PAH noch nicht festgelegt werden (Tuder et al. 1994, Mitani et al. 1999). Es ist bekannt, dass Mastzellen unter anderem ein reichhaltiger Speicher für Interleukin-4 sind, sowie für andere Faktoren, die in der Lage sind autoreaktive B-Lymphozyten zu aktivieren und stimulieren, damit diese dann Autoantikörper bilden. Hierbei werden unter anderem Antikörper gegen Endothelzellen von den B-Zellen abgegeben (Galli et al. 2005, Benoist et al. 2002).

In den letzten Jahren konnten in diversen Studien Mastzellen verschiedene Funktionen zugeschrieben werden. Hierunter fallen nicht nur Entzündungsreaktionen unterstützende, sondern auch immunsuppressive und antiinflammatorische Funktionen (Galli et al. 2008).

In dieser Studie wurde eine signifikant erhöhte Konzentration an T-Lymphozyten in Gefäßen, die ein pulmonalarteriell Remodelling erfahren haben, entdeckt (Abb. 26, 31). Übereinstimmend mit den Ergebnissen einer neuen Studie von Austin et. al. (Austin et al. 2010) führten die erhobenen statistischen Auswertungen zu der Annahme, dass die CD8-positiven T-Lymphozyten ebenfalls stark an der Bildung vaskulärer Läsionen beteiligt zu sein scheinen. Bis jetzt ist wenig bekannt über die Rolle der CD8-positiven T-Zellen bei der Pathogenese der PAH. Eine perivaskuläre Infiltration von CD8-positiven T-Zellen könnte assoziiert werden mit einer Verhinderung der Apoptose von Endothelzellen oder einem Anti-Apoptose-Signal, wie es bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie oder einem angeborenen Herzfehler beschrieben wurde (Levy et al. 2007).

Durch eine Infiltration von T-Lymphozyten kann es zu einer Freisetzung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und einer Interaktion mit Endothelzellen kommen, was zu einer vermehrten Angiogenese führen könnte (Mach et al. 1999, Freeman et al. 1995). Nicht zuletzt wird durch die Aktivierung des nukleären Faktors aktivierter T-Lymphozyten (NFAT), ein Transkriptionsfaktor, die Gentranskription von T-Zell-Zytokinen initiiert. Über eine Aktivierung des NFAT wird bei der pulmonalarteriellen Hypertonie ein Remodelling des mitochondrialen Membranpotentials und der mitochondrialen Struktur, sowie eine inflammatorische Reaktion bewirkt (Bonnet et al. 2007). Somit könnte NFAT ein wichtiger Biomarker sein und ein entscheidender Baustein für die Therapie der PAH.

Diskussion

In dieser Studie wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, die eine Differenzierung der T-Lymphozyten in ihre Untergruppen ermöglichte. So konnten zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen separat dargestellt und ausgewertet werden (Abb. 28-36).

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Akkumulation von zytotoxischen T-Zellen im Bereich pulmonaler Gefäße bei PAH-Lungen (Abb. 31).

Bei den regulatorischen T-Zellen handelt es sich um sehr wichtige Zellen des Immunsystems. So regulieren und steuern diese beispielsweise die immunologischen Reaktionen der T-Helfer-Zellen vom Typ 1 und 2 und sind außerdem unabdingbar für die Aufrechterhaltung einer gewissen immunologischen Toleranz (Sakaguchi et al. 2006).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass ein quantitativ reduziertes Vorkommen von regulatorischen T-Zellen bei verschiedenen autoimmunologischen Krankheitsbildern zu verzeichnen ist wie beispielsweise bei multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes, Diabetes mellitus Typ 1 und rheumatoider Arthritis (Yudoh et al. 2000, Liu et al. 2004, Danese et al. 2007).

Die pulmonalarterielle Hypertonie kann als ein autoimmunologisches Krankheitsbild angesehen werden, da es signifikante Beweise für auto-antigen gesteuerte oder vermittelte Reaktionen unter PAH gibt (Tamby et al. 2005, Tamby et al. 2006).

In dieser Studie wurden im Vergleich zu Donorlungen weniger FOXP3-positive regulatorische T-Zellen in PAH-Lungen nachgewiesen, dies könnte die These einer autoimmunologischen Komponente der PAH stützen (Abb. 34). Wie bereits oben erwähnt, wird das Gleichgewicht zwischen der Th1- und Th2-gesteuerten Immunantwort durch die regulatorischen T-Zellen kontrolliert und beeinflusst. Des weiteren sind die regulatorischen T-Zellen verantwortlich für die Aufrechterhaltung einer immunologischen Toleranz (Sakaguchi et al. 2006).

Eine verminderte Aktivität oder die Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen zählt wahrscheinlich mit zu den Ursachen für lokale inflammatorische Prozesse und proinflammatorische Reaktionen bei PAH. Es konnte gezeigt werden, dass eine Th2-gesteuerte Immunantwort zur Freisetzung von Signalen führt, die eine Zellproliferation, eine Differenzierung von smooth-muscle-actin positiven Zellen und eine Neuordnung der zellulären Organisation induzieren. Dies wiederum resultiert in einer schwergradig veränderten Wandstruktur pulmonalarterieller Gefäße (Daley et al. 2008).

Passend zu den Ergebnissen aus diesem Projekt, die ein vermindertes Vorkommen von

Diskussion

regulatorischen T-Zellen in PAH-Lungen detektierten, konnten Taraseviciene-Stewart in Experimenten zeigen, dass unter normooxischen Bedingungen bei Ratten ohne Thymus, die einen T-Zell-Mangel aufwiesen, die Entwicklung obliterativer vaskulärer Läsionen stattfand, wenn diese Ratten mit einem VEGFR-Blocker (vascular endothelial growth factor receptor blocker) behandelt wurden (Taraseviciene-Stewart 2007). Die Entwicklung pulmonal-vaskulärer Läsionen bei diesen Ratten kann begründet sein durch eine überschießende Immunantwort, welche wiederum bedingt sein könnte durch das reduzierte Vorkommen der regulatorischen T-Zellen.

Dennoch ist bisher nicht genau bekannt, ob ein Fehlen von regulatorischen T-Zellen suffizient genug ist, um das Entstehen angioproliferativer pulmonal-vaskulärer Läsionen im experimentellen Model der pulmonalen Hypertonie bei Ratten, denen ein VEGFR-Blocker injiziert wurde, zu fördern (Taraseviciene-Stewart 2007).

Andere Arbeiten zeigen, dass PAH-Patienten eine erhöhte Konzentration an zirkulierenden CD4- und CD25-positiven regulatorischen T-Zellen aufweisen (Ulrich et al. 2008, Austin et al.). Diese Studie trifft jedoch keine Aussage über das Vorkommen von regulatorischen T-Zellen in den Bereichen komplexer, plexiformer Gefäßläsionen von PAH-Lungen. Zunächst erscheinen diese Ergebnisse im Widerspruch mit hier erhobenen Daten. Jedoch kann dies auch dadurch erklärt werden, dass ein vermindertes Vorkommen von intrapulmonalen Treg-Zellen durch eine erhöhte Extravasation entsteht, und es somit in Folge dessen zu einem Anstieg der zirkulierenden Treg Zellen im Rahmen der PAH-kommt.

Die Datenlage spricht für ein bevorzugtes Abwandern der regulatorischen T-Zellen in die zirkulierende Blutbahn, was ausgelöst sein kann durch Signale bestimmter Chemokine und Zytokine. Übereinstimmend mit den vorliegenden Erkenntnissen wird bei Patienten, die an humanem immundefizienz Virus (HIV) erkrankt sind, von einer reduzierten Konzentration an regulatorischen T-Zellen in lymphoidem Gewebe berichtet und einer Umverteilung dieser Zellen in das periphere Blut (Mozos et al. 2007).

Des weiteren konnte bei Untersuchungen von Patienten mit Arthritis eine regelrecht kompartment-spezifische Verteilung der regulatorischen T-Zellen demonstriert werden, da sich bei diesen Patienten eine Anreicherung jener Zellen im Bereich der Gelenke findet (Oh et al. 2010).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass all diese Untersuchungen zeigen, dass ein intaktes Immunsystem unabdingbar für die Vitalität ist. Jegliches Ungleichgewicht oder jede Fehlfunktion des Immunsystems kann auch pathologische Veränderungen im Bereich pulmonaler Gefäße initiieren oder fördern.

Diskussion

Die in dieser Studie nachgewiesene Akkumulation von T-Lymphozyten und der Untergruppe der zytotoxischen T-Zellen in Bereichen pulmonaler Gefäße und das hingegen reduzierte Vorkommen von regulatorischen T-Zellen in diesen Bereichen stehen für ablaufende inflammatorische und entzündliche Prozesse. Die beobachtete schwerpunktmäßige Ansammlung der T-Zellen im gesamten und der zytotoxischen T-Zellen in Bereichen von Lungengefäßen mit eher kleinem Durchmesser könnten den ausgeprägten Streß und die schwere der Läsionen in diesen Widerstandsgefäßen widerspiegeln. Die Schwere des inflammatorischen und immunologischen Prozesses könnte in Assoziation stehen mit dem Grad des pathologischen pulmonalen Gefäßremodelings.

Weitere Studien zu den immunmodulatorischen Mechanismen der hier untersuchten Zelltypen sind notwendig und entscheidend für das Verständnis der Immunpathologie der PAH.

In der vorliegenden Studie konnte die Infiltration und Akkumulation verschiedener inflammatorischer Zellen und Immunzellen in den Wandschichten pulmonaler Gefäße bei PAH-Lungen demonstriert werden. Die genauen Mechanismen auf zellulärer Ebene, die zu den chronisch-inflammatorischen Abläufen führen, verbleiben weiterhin unklar.

Auf Grund vorliegender Ergebnisse kann angenommen werden, dass die perivaskulären Inflammationsreaktionen durch aktivierte Fibroblasten der Adventitia entstehen, welche durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen eine Akkumulation, Retention und Aktivierung von Immunzellen und inflammatorischen Zellen induzieren.

Die funktionale Bedeutung von Entzündungszellen für den Prozess des pulmonalen Gefäßremodelings wurde hauptsächlich erforscht an Zellkulturen oder durch Experimente an transgenen oder chimären Tieren. Um detailliertere Informationen über die funktionelle Rolle inflammatorischer Zellen im Prozess des pulmonal vaskulären Remodelings zu gewinnen, wurde in einer Studie SDF-1 mit Hilfe eines hoch spezifischen Spiegelmers geblockt. SDF-1 ist ein generell chemotaktisch wirkendes Protein. Spiegelmer zählen zu einer neuen Klasse oligonukleotider Therapeutika, die aus dem L-Stereoisomer der RNA gewonnen werden. Sie verfügen über eine hohe biologische Stabilität und haben keinerlei immunstimulierende Eigenschaften. Das Spiegelmer NOX-A12 ist ein 45-nukleotide L-RNA oligonukleotid, welches mit einem 40kD polyethylenglykol konjugiert wurde, um seine Plasm-Halbwertszeit um einige Stunden zu verlängern. NOX-A12 bindet an SDF-1 bei humanen Mäusen und bei Ratten und inhibiert dieses (Darisipudi et al. 2011). NOX-A12 reduzierte die Akkumulierung von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen im Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie. Hierdurch ergab sich als Konsequenz eine

Diskussion

Reduktion des pulmonalen Gefäßremodellings, sowie eine Verbesserung der Hämodynamik und der Ausprägung der Rechtsherzhypertrophie.

Als potentielle Limitierung dieser Arbeit muß folgender Aspekt angesehen werden, der auf alle Studien mit explantiertem Lungengewebe von PAH-Patienten zutreffend ist. Im Vergleich mit anderen Krankheitsbildern ist es obsolet, bei Patienten Biopsien zu entnehmen, bei denen sich die Entwicklung der PAH noch in Progress befindet, da hier die Komplikationsrate viel zu hoch ist. Dies führt dazu, dass an dieser Stelle die Erkenntnisse über die Pathologie der PAH nur aus explantiertem Gewebe, welches bereits das Endstadium einer voll entwickelten PAH zeigt, gewonnen werden können.

Als Schlußfolgerung ist zu sagen, dass zwei wichtige Fragen in Zukunft zu klären sind:

- 1) was sind die Gründe für ein quantitativ stark erhöhtes oder erniedrigtes Vorkommen bestimmter Immunzellen im Lungengewebe von PAH-Patienten?
- 2) haben diese Erkenntnisse pathologische oder klinische Auswirkungen?

Es ist ein genaueres Verständnis der Mechanismen und Prozesse notwendig, die die Verbindung zwischen Immunzellen, einer abnormen Angiogenese und dem pulmonalarteriellen Remodelling bei der pulmonalen Hypertonie darstellen. Ein detailliertes Verständnis all dieser miteinander verknüpften Mechanismen ist nötig, um potentiell therapeutische Strategien für die Behandlung und die Prävention der PAH erstellen zu können.

Bisher besteht die Basistherapie der PAH aus einer Linderung der vorherrschenden Symptome wie Dyspnoe, stark eingeschränkte Leistungsfähigkeit und Folgen der Rechtsherzinsuffizienz. Die Therapiebausteine setzen sich zusammen aus den Komponenten Sauerstofftherapie, Diuretikagabe und Antikoagulation. Zu den aktuell verwendeten Medikamentengruppen zählen Calciumantagonisten, Prostazyklinanaloga, PDE-5-Inhibitoren und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert aus den Erkenntnissen der Immunpathologie der PAH weitere Schlüsse in Hinblick auf die Therapieoptionen zu ziehen. Im Sinne des „Hit hard and early“-Konzeptes wären zum Beispiel als Eskalation Kombinationstherapien denkbar, die nicht nur auf die Symptomatik der Krankheit abzielen, sondern vielleicht sogar in den Prozess der zugrundeliegenden Vaskulopathie eingreifen. So könnte es die Therapie der PAH revolutionieren, wenn es gelingen würde, das pulmonalarterielle Remodelling an einer Stelle der Kausalkette zu unterbrechen oder zu unterbinden. Hierfür sind die Erkenntnisse der vorliegenden Studie über die Präsenz bestimmter Immunzellen obligat.

5. Zusammenfassung

Bei der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) handelt es sich um ein fortschreitendes Krankheitsbild mit verheerenden Folgen für das kardiopulmonale System der betroffenen Patienten. Die pulmonalarterielle Hypertonie ist charakterisiert durch ein pathologisches Remodelling innerhalb der pulmonalen Gefäßwandschichten, sowie durch eine vermehrte Vasokonstriktion dieser Gefäße.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass sowohl immunologische, wie auch inflammatorische Prozesse eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie spielen.

In der vorliegenden Studie wurden die genaue Verteilung und Anzahl bestimmter Immun- und Inflammationszellen in Lungengewebsschnitten und im unmittelbaren Bereich pulmonaler Gefäße verschiedener Größenkategorien explantierter Lungen von PAH-Patienten evaluiert. Die Auswertung erfolgte stets im direkten Vergleich zwischen gesundem Lungengewebe und dem Lungengewebe von an PAH erkrankten Patienten.

Für diese Analysen wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen von histologischen Lungengewebsschnitten etabliert und morphometrische Untersuchungen der pulmonalen Gefäße durchgeführt.

Die quantitative Auswertung der Gesamtzahl an CD68-, CD3-, CD8-, CD209-, FOXP3- und Toluidinblau-positiven Zellen detektierte ein vermehrtes Vorkommen von Mastzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen in den PAH-Lungenschnitten verglichen mit Schnitten gesunder Lungen. Hingegen war eine deutlich reduzierte Infiltration regulatorischer T-Zellen in PAH-Lungen zu verzeichnen.

Die Analyse der positiv gefärbten Zellen in den Bereichen vaskulärer Läsionen zeigte eine deutliche Akkumulation und Infiltration von Makrophagen, Mastzellen, dendritischen Zellen, CD3- und CD8-positiven T-Zellen in pulmonalen Gefäßen mit kleinem (20-50 µm), mittlerem (51-150 µm) und großem (>150 µm) Durchmesser bei PAH-Patienten, im Vergleich zu gesunden Donor-Lungen. Interessanter Weise konnte jedoch auch im Bereich der pathologisch veränderten pulmonalen Gefäße bei PAH-Lungen ein reduziertes Vorkommen regulatorischer T-Zellen verzeichnet werden im Vergleich zum Perivaskulärgewebe gesunder Lungen.

Diese Studie zeigt deutliche Veränderungen der Zellinfiltration immunologischer und inflammatorischer Zellen in den Bereichen vaskulärer Läsionen bei PAH-Patienten verglichen mit gesunden Lungen.

Folglich könnte die genauere Beobachtung von Immunzellen, Inflammationszellen und den von ihnen sezernierten Zytokinen und Chemokinen ein neuer Denkansatz sein für die Therapie der PAH, sowie für ein Monitoring des Fortschreitens dieses Krankheitsbildes.

6. Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disease with dramatic effects on the cardiopulmonary system of concerned patients. The disease is characterized by a vascular remodeling in all layers of pulmonary vessels and an abnormal increased vasoconstriction within these vessels.

Recent studies have revealed that both immune and inflammatory processes play an important and crucial role in the pathogenesis of idiopathic PAH (PAH).

In the present study we systematically evaluated the distribution and number of different specific immune cells and inflammatory cells in lung tissues and in different categories of pulmonary arteries (20-50 μm , 51-150 μm and >150 μm) from explanted lungs of PAH patients by using and establishing immunohistochemical and morphometric techniques.

For evaluating this data lung tissue of PAH patients was compared to healthy donor lungs.

First all stained cells in the whole tissue of the histologic lung sections were counted and after that the numbers of stained cells close to pulmonary vessels and in the area of vascular lesions were evaluated.

Quantification of the total sum of macrophages, mast cells, dendritic cells, T-cells, cytotoxic T-cells and regulatory T-cells showed a significant increase of infiltrates from all these cells in PAH lungs as compared to controls, except of regulatory T-cells. A significant decrease of Treg cell infiltrates in PAH lungs was found. Further quantification of cells in vascular lesions revealed an accumulation and infiltration of macrophages, mast cells, dendritic cells, CD 3- and CD 8-positive cells in smaller (20-50 μm) and medium (51-150 μm) size pulmonary arteries of PAH patients as compared to donor lungs. Most interestingly, absence or low number of Treg cells was observed in remodeled pulmonary vasculature of PAH patients.

Our findings show differences and alterations in immune and inflammatory cell infiltrations in PAH vascular lesions compared to donor lungs.

Thus, targeting and analysing immune cells and inflammatory cells and their secreted chemokines and cytokines in PAH patients may be a novel approach to treat PAH and monitor the progress of this disease.

7. Literaturverzeichnis

Austin ED, Rock MT, Mosse CA, Vnencak-Jones CL, Yoder SM, Robbins IM, Loyd JE, Meyrick BO. T lymphocyte subset abnormalities in the blood and lung in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2009;104:454-462.

Barst RJ. Pulmonary hypertension: Past, present and future. *Ann Thorac Med* 2008; 3: 1-4.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 296-302

Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Cx(3)c chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1419-1425.

Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, Strassheim D, Stenmark KR. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L238-250.

Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 2002; 420: 875-878.

Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED. The nuclear factor of activated t cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11418-11423.

Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159–65.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358: 1119-1123.

Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci* 2000 October; 320 (4) : 223-32.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension [see comments]. *N Engl J Med* 1992 July 9; 327 (2) : 70-5.

Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lhermine A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Chemokine rantes in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:534-539.

Daley E, Emson C, Guignabert C, de Waal Malefyt R, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF, Rabinovitch M, Grunig E, Grunig G. Pulmonary arterial remodeling induced by a th2 immune response. *J Exp Med* 2008; 205: 361-372.

Darisipudi MN, Kulkarni OP, Sayyed SG, Ryu M, Migliorini A, Sagrinati C, Parente E, Vater A, Eulberg D, Klussmann S, et al. Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease. *Am J Pathol* 2011;179:116-124.

Literaturverzeichnis

- Danese S**, Rutella S. The janus face of cd4+cd25+ regulatory t cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem* 2007; 14: 649-666.
- Davis C**, Fischer J, Ley K, Sarembock IJ. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1699–1709.
- Dandel M**, Lehmkuhl HB, Hetzer R. Advances in the medical treatment of pulmonary hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2005; 28 (5-6) : 311-24.
- Fartoukh M**, Emilie D, Le Gall C, Monti G, Simonneau G, Humbert M. Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mrna expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension. *Chest* 1998;114: 50S-51S.
- Frid MG**, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 2006;168:659-669.
- Fairweather D**, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* 2009; 33: 222-230.
- Fishman AP**. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 2001 September; 22 (3): 385-91, vii.
- Freeman MR**, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, Klagsbrun M. Peripheral blood t lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: A potential role for t cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4140-4145.
- Ghofrani HA**, Barst RJ, Benza RL, Champion HC, Fagan KA, Grimminger F, Humbert M, Simonneau G, Stewart DJ, Ventura C, Rubin LJ. Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S108-117.
- Grabbe J**, Welker P, Rosenbach T, Nurnberg W, Kruger-Krasagakes S, Artuc M, Fiebiger E, Henz BM. Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, hacat, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J Invest Dermatol* 1996;107:219-224.
- Galie N**, Ghofrani HA, Torbicki A et al. Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353: 2148-2157.
- Galie N**, Torbicki A, Barst R et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 2243-2278
- Galli SJ**, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: Negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:478-486.
- Galli SJ**, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:135-142.
- Giaid A**, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993 June 17; 328 (24) : 1732-9.

Literaturverzeichnis

Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S10-19.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16; 43 (12 Suppl S) : 13S-24S.

Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1628-1631.

Heath D, Yacoub M. Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Clin Pathol* 1991;44:1003-1006.

Hall S, Brogan P, Haworth SG, Klein N. Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax* 2009;64:778-783.

Hoeper MM, Spiekerkoetter E, Westerkamp Vet al. Intravenous iloprost for treatment failure of aerosolised iloprost in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2002; 20: 339-343

Hoeper MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E., Schranz D, Rosenkranz S et al. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. European guidelines 2009. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135: e2-e15.

Hoeper MM, Andreas S, Bastian A, Claussen M, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grohe C, Günther A, Halank M, Hammerl P, Held M, Krüger S, Lange TJ, Reichenberger F, Sablotzki A, Staehler G, Stark W, Wirtz H, Witt C, Behr J. Pulmonary hypertension due to chronic lung disease. Recommendations of the cologne Consensus Conference 2010. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135: S115-S124.

Hoeper MM. Aktuelle Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie* 2006; 60: 428-445.

Hoeper MM, Halank M, Marx C et al. Bosentan therapy for portopulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2005; 25: 502-508.

Isern RA, Yaneva M, Weiner E, Parke A, Rothfield N, Dantzker D, Rich S, Arnett FC. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: Association with anti-ku. *Am J Med* 1992;93:307-312.

Itho T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H et al., Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* 2006; 11: 158-163.

Klob J. Endarteriitis pulmonalis deformans. *Wien Wochenblatt* 1865; (31): 45.

Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 2009; 34: 888–894.

Laumanns IP, Fink L, Wilhelm J, Wolff JC, Mitnacht-Kraus R, Graef-Hoechst S, Stein MM, Bohle RM, Klepetko W, Hoda MA, Schermuly RT, Grimminger F, Seeger W, Voswinckel R. The noncanonical wnt pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:683-691.

Literaturverzeichnis

Levy M, Maurey C, Celermajor DS, Vouhe PR, Danel C, Bonnet D, Israel-Biet D. Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:803-810.

Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased cd4+cd25+ t cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004; 59: 198-202.

Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65: S140–S146.

Li M, Riddle SR, Frid MG, El Kasmi KC, McKinsey TA, Sokol RJ, Strassheim D, Meyrick B, Yeager ME, Flockton AR, McKeon BA, Lemon DD, Horn TR, Anwar A, Barajas C, Stenmark KR. Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol*;187:2711-2722.

Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC, Bydlowski SP. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000;139:618– 23.

Loscalzo J. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992 July 9; 327 (2) : 117-9.

Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*;22:231-237.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454: 428–435.

Mitani Y, Ueda M, Maruyama K, Shimpo H, Kojima A, Matsumura M, Aoki K, Sakurai M. Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* 1999;54:88-90.

Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a cd40l-dependent mechanism: Implications for tubule formation. *Am J Pathol* 1999;154:229-238.

Mozos A, Garrido M, Carreras J, Plana M, Diaz A, Alos L, Campo E, Garcia F, Martinez A. Redistribution of foxp3-positive regulatory t cells from lymphoid tissues to peripheral blood in hiv-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46:529-537.

Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: A perspective. *Eur Respir J* 2005;26:1110-1118.

Oh S, Rankin AL, Caton AJ. Cd4+cd25+ regulatory t cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:97-111.

Olschewski H, Rose F, Grunig E, Ghofrani HA, Walmrath D, Schulz R, Schermuly R, Grimminger F, Seeger W. Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *J Lab Clin Med* 2001 December; 138 (6) : 367-77.

Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G, Humbert M. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007;29:462-468.

Pietra GG, Capron F et al.: Pathologic Assessment of Vasculopathies in Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:25-32.

Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A. Tolerance and m2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14978-14983.

Pullamsetti SS, R. Savai, W. Janssen, B.K. Dahal, W. Seeger, F. Grimminger, H.A. Ghofrani, N. Weissmann and R.T. Schermuly. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 7-14.

Pullamsetti SS, R.T. Schermuly. Endothelin receptor antagonists in preclinical models of pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (S2): 3-13.

Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2008;118:2372-2379.

Romberg E. Über Sklerose der Pulmonalarterie. *Dtsch Arch Klin Med* 1891; (48): 197-206.

Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997 January 9; 336(2): 111-7.

Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 111–115.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 896-903.

Seeger W. Pulmonale Hypertonie. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin. 2000.

Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S43-54.

Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 5S-12S

Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Satoh T, Nakanishi N. Increased plasma p-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000;102:2720-2725.

Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Dartevelle P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of endothelium-derived cc chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1041-1047.

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by pdgf inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115: 2811-2821.

Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, Dumitrescu R, Tian X, Weissmann N, Ghofrani HA, Kaulen C, Dunkern T, Schudt C, Voswinckel R, Zhou J, Samidurai A, Klepetko W, Paddenberger R, Kummer W, Seeger W, Grimminger F. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: Target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 2007; 115: 2331-2339.

Literaturverzeichnis

Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* Vol. 8 2010; 443-455.

Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2005;98:715-721.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ cd25+ cd4+ natural regulatory t cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.

Savai R, S. Pullamsetti S, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dhalal B, Vater A, Klusmann S, Ghofrani H, Weissmann N, Klepetko W, Banat G, Seeger W, Grimminger F, Schermuly R.T. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of Idiopathic Pulmonary Arteriel Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;Vol 186:897-908.

Sitbon O, Humbert M, Jais X et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111: 3105–3111.

Sitbon O, Gressin V, Speich Ret al. Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1212-1217.

Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. *Clin Chest Med* 2001; 22: 405–18.

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 June; 159 (6) : 1925-32.

Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994;144:275-285.

Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillevin L, Boissier MC, Mouthon L. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2005;60:765-772.

Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, Simonneau G, Fermanian J, Weill B, Guillevin L, Mouthon L. Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2006;28:799-807.

Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, Scerbavicius R, Burns N, Cool C, Wood K, Parr JE, Boackle SA, Voelkel NF. Absence of t cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1280-1289.

Ulrich S, Nicolls MR, Taraseviciene L, Speich R, Voelkel N. Increased regulatory and decreased cd8+ cytotoxic t cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration* 2008;75:272-280.

van Rijt LS, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma: A function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1125-1134.

Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Mitsialis SA, Kourembanas S. Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2011;123:1986-1995.

Voelkel N, Tuder R, Bridges J, Arend W. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 664–675.

Wang W, Yan H, Zhu W, Cui Y, Chen J, Wang X, Li S, Zhu J. Impairment of monocyte-derived dendritic cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Clin Immunol* 2009;29:705-713.

Wilson HM, Barker RN, Erwig LP. Macrophages: Promising targets for the treatment of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:234-243.

Yudoh K, Matsuno H, Osada R, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T. Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 2000;43:2178-2188.

Young KC, Torres E, Hatzistergos KE, Hehre D, Suguihara C, Hare JM. Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia- induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 2009; 104: 1293–1301.

8. Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Julia Anna Kolbe

Danksagung

9. Danksagung

Ich danke von Herzen allen, die an der Entstehung und dem Fertigstellen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Ralph T. Schermuly für die Vergabe des Themas, die fachliche Beratung und die gute Unterstützung.

Dr. Rajkumar Savai danke ich für die motivierte Einarbeitung in die Thematik, die gute Anleitung bei den Arbeiten im Labor und für viele konstruktive Diskussionen.

Ganz großer Dank gilt Ewa Bieniek für die kompetente Einweisung in die Arbeitsschritte der Immunhistologie, ihre Hilfsbereitschaft und ihren Perfektionismus bei jedem einzelnen Arbeitsschritt.

Maïke Barowski und Christina Vroom danke ich für ihre Unterstützung bei tagelangen Auswertungen der Lungenschnitte.

Allen Mitarbeitern des Seeger-Labors und des ECCPS vielen Dank für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor und der Datenerhebung.

Ich danke Catharina Horstmann dafür, dass sie die beste Freundin der Welt ist und mit mir durch alle Höhen und Tiefen geht.

Janne Paul Schmidt danke ich für dafür, dass er mich in allem unterstützt hat, immer an mich geglaubt hat und es mir an nichts hat fehlen lassen.

Christian Castrup danke ich für die kompetente Beratung und Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen zu jeder Tageszeit.

Lieber Lars, Dir danke ich dafür, dass Du in mein Leben getreten bist.

Ich danke Rudi für stundenlange Spaziergänge und dafür, dass er mir immer gute Laune macht.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen wundervollen Eltern, für ihre ausnahmslose Unterstützung in jeder Situation und ihr liebevolles Interesse an allem was ich tue. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6292-7



9 783835 196292 7